

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**



**POLARIDAD Y MORFOGÉNESIS DE LOS  
MUTANTES EN EL GEN *CDC15* DE *Saccharomyces  
cerevisiae*. IMPLICACIÓN EN EL CICLO CELULAR**

Memoria que para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas  
presenta:

**JAVIER JIMÉNEZ JIMÉNEZ**

Trabajo dirigido por los doctores:

**Dr. MIGUEL SÁNCHEZ PÉREZ  
Dr. CÉSAR NOMBELA-CANO**



**ARCHIVO**

MADRID, Marzo de 1998.

**RAFAEL ROTGER ANGLADA, Director del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.**

**CERTIFICA:** Que **D. JAVIER JIMÉNEZ JIMÉNEZ** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los doctores **MIGUEL SÁNCHEZ PÉREZ** y **CÉSAR NOMBELA CANO**, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con el título: **“Polaridad y morfogénesis de los mutantes en el gen *CDC15* de *Saccharomyces cerevisiae*. Implicación en el ciclo celular”**.

Para que así conste firmo la presente certificación en Madrid a 16 de Febrero de 1998.

**Fdo: Dr. Rafael Rotger Anglada.**

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a:

- Una Beca de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia desde el año 1994 hasta el año 1997.

- El siguiente proyecto de investigación:

“ Caracterización y manipulación de funciones esenciales para la integridad celular de la levadura con el fin de mejorar los procesos de expresión y liberación de proteínas y otros aspectos intracelulares” (BIO95-0303).

**A Antonio, Teresa y Ofelia  
por apoyarme siempre  
en mis decisiones y  
ser la red de mis errores.**



Después de escribir tanto "*se clonó, se transformó, se incubó.....*", a uno le cuesta cambiar de registro y volver al estilo personal, estilo que sin duda merecen todas las personas que me han ayudado en la realización de este trabajo y a quienes, con estas líneas, deseo expresar mi más sincera gratitud.

A César Nombela, por haberme permitido formar parte de este grupo de investigación, gracias por tu apoyo, confianza y cordialidad.

A Miguel Sánchez, por ser un jefe, un microbiólogo y un psicólogo genial. Por que tu despacho, lejos de ser la cámara de tortura medieval del jefe, ha sido como una Caja de Pandora donde han entrado problemas y desaliento y han salido soluciones y ánimo renovado.

A Víctor, por haber hecho tuyos mis problemas con los *bichos*, por tus muchos desvelos piruleantes, por tu amistad, por..... y, porque si hay algún esbozo de brillantez en este trabajo, sin duda, tú eres el responsable.

A José Martínez Peinado, por acceder a ser mi tutor y por la simplificación de toda la burocracia que tu actitud a propiciado.

A Txema, por todas las misóginas mañanas de lunes, tardes de miércoles y mediodías de viernes, sin ellas, realmente habrían acabado con nosotros. A Inma, por la cantidad de energía libre que has empleado en mantener la entropía de mi mesa en límites termodinámicamente compatibles con el trabajo en el laboratorio. A Mercedes, por el fino diablillo que llevas dentro y por lo fácil y agradable que ha sido compartir la mesa con vosotros dos. A don Humberto, porque, me confieso, has sido mi punto de referencia en la poyata, además de infinita fuente de los más insospechados plásmidos y cepas. A María (Soler), por tus denodados esfuerzos para que esto sea algo más que un laboratorio. A María (Molina), por tu cariño, por que siempre tienes una solución sencilla a un problema imposible y por todo el esfuerzo que dedicas para que seamos un grupo de investigación. A Aïda, nuestra rubia particular, por obligarnos a derivar parte de nuestra atención a tu surrealista sentido del humor. A Julio, porque ya estaban pudiendo con Txema y conmigo. A Lubi por amenizarme los "ratitos" al ordenador. A Federicorr, porque eres más noble que la camisa del Conde Morlr, por tu amistad y por

todo lo que te he hecho currar (no se lleven a engaño, ha sido mucho). A mama Molerín, por tu microtacataca y porque siempre has estado aquí. A Jesús Plá por tus consejos y disposición. A Mari Ángeles, porque tu acento cantarín me ha sacado del laboratorio y me ha llevado siempre muy lejos. A Isabel, compañera de quinta en los duros momentos del servicio laboratorimilitar. A Inma Ríos, por obligarme a estar en forma. A Jose, por ser la viva reencarnación del profesor Bacterio y por las muchas risas que, más que interrumpir, sobreexpresas bajo el promotor *GAL*. A Concha, por tu amabilidad y por que siempre te has interesado y has valorado mi trabajo. A Maite, por dejarme rebautizar a tu perro (estoy seguro de que eso no se lo permite a cualquiera), por tu amistad y por esos días haciendo el cabra por ahí. A Benito, el mejor cerrajero al Este del Manzanares, el mejor arreglalo todo y, siempre, con buena cara. A Maribel, Rosita y Mar, por que mi DNA lo hicisteis vuestro, A Rosa, que me hizo volar buscado piedras monumentales. A Carmen, la chica "candilyt", por escuchar siempre mi opinión y por ayudarme siempre con la tuya. A Juanillo el bicimaniaco clonador. A Anabel, por lo que tú, yo y Txema sabemos. A José Alberto, por los mil y un carretes. A Alberto y Amalia, por vuestra citocordialidad y el interés que siempre os ha despertado *lytl*. A los consejos correctores de Carmina. Al cronómetro de Maite y de Gemma, a la continua disposición de Mar y de Paloma, a la sonrisa de Lucia Rosalia y de M<sup>a</sup> Luisa.

No puedo ni deseo olvidarme de otro montón de gente que, desde fuera del laboratorio, han permitido que cada lunes fuera capaz de apagar el despertador.

A ti Miguel, porque juntos hemos conquistado lo inútil y hemos llegado a la conclusión de que no sabemos qué es, pero está, existe y merece la pena lograrlo, muchas gracias Compañero, gracias por estar aquí, gracias por ser mi amigo (no te voy a dejar enseñarle a escalar, lo haré yo). También guardo un sitio para ti, Ismael, y te aseguro que es más cálido que el hueco de aquel glaciar. A Juanma por vigilarme por detrás del hombro día tras día.

A Ofelia porque, estoy pensando que... seguro que defiendes esto mejor que yo. Gracias por todo el enorme esfuerzo y comprensión que has puesto, sin los que, esta memoria, sin duda, la redactaría en otros términos.

También quiero expresar mi gratitud al señor Antonio y a la señora Teresa, gracias a vosotros, todo (excepto algunos resultados de esta memoria) tiene sentido dentro mi.

No quiero olvidarme de mis Hermanos, de mis Primos, de Tiabel, de Tía Sol de Tío Gregorio y de la señora Marina, gracias por estar aquí y por el cariño altruista que me dais cada día y que espero saber agradecerlos.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.- CICLO BIOLÓGICO DE <i>S. cerevisiae</i> .....	3
1.1.- Ciclo vegetativo.....	3
1.2.- Ciclo sexual.....	4
1.3.- Desarrollo pseudohifal en <i>Saccharomyces</i> .....	5
1.4.- Mutantes de ciclo celular o mutantes <i>cdc</i> ( <i>C</i> ell <i>D</i> ivision <i>C</i> ycle).....	7
1.5.- Regulación del ciclo celular en <i>S. cerevisiae</i> .....	7
1.5.1.- Progresión a través del ciclo celular.....	7
1.5.2.- El final de la mitosis.....	8
1.5.3.- Mecanismos de control del ciclo celular.....	12
1.5.3.1.- <i>Checkpoints</i> de daño en el DNA y de replicación del DNA.....	13
1.5.3.2.- <i>Checkpoint</i> del cuerpo polar del huso.....	14
2.- MORFOGÉNESIS Y POLARIDAD DE <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.1.- La Pared celular.....	16
2.1.1.- Composición y arquitectura de la pared celular.....	16
2.1.2.- Mutantes líticos.....	17
2.2.- Morfogénesis de <i>S. cerevisiae</i> .....	18
2.2.1.- Coordinación de la morfogénesis con el ciclo celular.....	18
2.3.- La polaridad celular.....	20
2.3.1.- ¿Cómo se elige el eje de polaridad celular en el proceso de gemación?.....	21
2.3.2.- ¿Cómo se instaura el eje de polaridad?.....	24
2.3.3.- Localización del lugar de septación: las septinas.....	27
2.3.4.- Implicaciones del citoesqueleto en la morfogénesis.....	28
2.3.5.- Otros componentes esenciales para la morfogénesis de <i>S. cerevisiae</i> .....	29
3.- EL MUTANTE <i>lyt1</i> DE <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
1.- CEPAS UTILIZADAS.....	37
1.1.- Cepas de levadura.....	37

1.2.- Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	37
1.3.- Conservación de las cepas.	37
2.- PLÁSMIDOS Y GENOTECAS.	37
2.1.- Plásmidos.	37
2.2.- Genotecas.	37
3.- MEDIOS DE CULTIVO.	40
3.1.- Medios de cultivo generales.	40
3.2.- Medios de cultivo especiales para <i>E. coli</i> .	40
3.3.- Medios de cultivo especiales para <i>S. cerevisiae</i> .	41
4.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MICROSCOPIA.	41
4.1.- Técnicas de microscopía de fluorescencia y contraste de fases.	41
4.1.1.- Lisis celular.	41
4.1.2.- Tinción de quitina.	41
4.1.3.- Tinción de actina.	42
4.1.4.- Tinción de núcleos.	42
4.2.- Microscopía electrónica de barrido.	42
4.3.- Microscopía electrónica de transmisión.	43
4.4.- Microscopía confocal.	43
5.- TÉCNICAS DE GENÉTICA CLÁSICA.	43
5.1.- Cruces y obtención de diploides.	43
5.2.- Segregación meiótica.	43
6.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	44
6.1.- Valoración de la actividad $\beta$ -Galactosidasa en colonias de levadura.	45
6.2.- Análisis rápido de colonias de <i>E. coli</i> "minilisis".	45
6.3.- Método rápido de transformación de levaduras.	46
6.4.- Extracción de DNA genómico de levaduras.	46
6.5.- Extracción de DNA plasmídico de levaduras.	46
7.- ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DNA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.	47
8.- ENSAYOS DE SEGUIMIENTO DEL CICLO CELULAR (ENSAYOS DE TIMING).	47
9.- HOMOLOGÍAS Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS.	47
<b>RESULTADOS.</b>	49
1.- RESCATE ALÉLICO DE LA MUTACIÓN <i>lyt1</i> DE <i>S. cerevisiae</i> .	49
1.1.- Estrategia del rescate alélico.	49
1.1.1.- Recuperación del alelo mutado mediante integración del alelo silvestre con YIp5.	49
1.1.2.- Recuperación del alelo mutado por PCR.	51
1.2.- Estudio de la mutación rescatada.	54
1.3.- Sustitución del alelo <i>cdc15-lyt1</i> en una cepa silvestre.	55
1.3.1.- Estrategia para la sustitución del alelo silvestre por el alelo mutante <i>cdc15-lyt1</i> .	55
2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES <i>cdc15-lyt1</i> .	58
2.1.- Morfología a 37°C de los mutantes <i>cdc15-lyt1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	58
2.2.- Polaridad en el mutante <i>cdc15-lyt1</i> a 37°C.	60
2.2.1.- Estudio de la polaridad en una cepa haploide de <i>S. cerevisiae</i> con la mutación <i>lyt1</i> .	60

2.2.2.- Estudio de la polaridad en una cepa diploide con ambos alelos del gen <i>CDC15</i> mutados.....	62
2.3.- Lisis en un mutante <i>cdc15-lyt1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	62
2.3.1.- Determinación del lugar por donde se produce la lisis de los mutantes <i>cdc15-lyt1</i> .....	63
2.4.- Efectos de la estabilización osmótica del medio de cultivo en el mutante <i>cdc15-lyt1</i> y en otros mutantes en el gen <i>CDC15</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	64
2.4.1.- Efecto del sorbitol 1M.....	64
2.4.2.- Efecto de otro estabilizador osmótico (NaCl 0.2M).....	67
2.5.- Naturaleza de las estructuras apicales aberrantes de los mutantes en el gen <i>CDC15</i> .....	68
2.6.- Tinción de actina de mutantes <i>cdc15-lyt1</i> .....	70
2.7.- Estudio de la septación de los mutantes en el gen <i>CDC15</i> a temperatura restrictiva.....	72
2.7.1.- Disposición del anillo de septinas en el mutante <i>cdc15</i> .....	73
2.8.- Tinción de núcleos.....	74
2.9.- Ciclo nuclear en los mutantes de la estirpe <i>lyt1</i> .....	76
2.9.1.- Ensayos de citometría en medio estabilizado con sorbitol 1M.....	79
2.10.- ¿El fenotipo <i>lyt1</i> es dependiente de alelo?.....	81
2.11.- Otros mutantes que manifiestan características fenotípicas similares.....	81
3.- DESARROLLO DEL CICLO CELULAR EN MUTANTES EN EL GEN <i>CDC15</i> Y OTROS FUNCIONALMENTE RELACIONADOS.....	83
3.1.- Ensayos de <i>timing</i> .....	85
3.1.1.- Ensayos de <i>timing</i> con la cepa L2C24d ( <i>cdc15-lyt1</i> ).....	85
3.1.2.- Ensayos de <i>timing</i> en un mutante en el gen <i>TEM1</i> .....	86
3.1.3.- Ensayos de <i>timing</i> en un mutante en el gen <i>CDC10</i> .....	87
3.1.4.- Ensayos de <i>timing</i> en el doble mutante <i>cdc10 cdc15</i> .....	88
3.1.5.- Ensayos de <i>timing</i> con la cepa MY1( <i>cdc15-lyt1/cdc15-1</i> ).....	88
3.2.- Expresión del fenotipo de los mutantes en el gen <i>CDC15</i> .....	90
3.2.1.- Influencia de la adición de medio de cultivo fresco en el momento de comenzar la incubación a 37°C.....	90
3.2.2.- Influencia de la concentración de glucosa en el medio sobre la expresión del fenotipo.....	94
3.2.3.- Influencia de la variación del pH al renovar el medio.....	95
3.2.4.- Existencia de alguna sustancia inductora de la expresión del fenotipo.....	96
3.2.5.- Existencia de alguna sustancia inhibidora de la expresión del fenotipo.....	97
4.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON Cdc15p.....	99
<b>DISCUSIÓN</b> .....	101
1.- RESCATE ALÉLICO DE LA MUTACIÓN <i>lyt1</i> .....	101
1.1.- La sustitución alélica del alelo mutante <i>cdc15-lyt1</i> en una cepa silvestre.....	101
2.- FENOTIPO DE LOS MUTANTES EN EL GEN <i>CDC15</i> .....	102
2.1.- El fenotipo de los mutantes <i>cdc15</i> es alelo-independiente.....	102

2.2.- ¿Corresponde la estructura apical aberrante a un proceso anómalo de gemación?.....	103
2.3.- Topología de la lisis.....	103
2.4.- Implicación de Cdc15p en el proceso de septación.....	104
2.5.- Influencia de la septación en la elección del patrón de polaridad.....	105
2.6.- Los mutantes <i>cdc15</i> no muestran una parada estricta del ciclo celular.....	106
2.7.- Influencia de la estabilización osmótica del medio en el fenotipo de los mutantes <i>cdc15</i> .....	106
3.- CICLO CELULAR DE LOS MUTANTES ESTUDIADOS CON ANOMALÍAS EN EL FINAL DE LA MITOSIS.....	108
3.1.- Ciclo celular de los mutantes <i>cdc15</i> .....	108
3.2.- Ciclo celular del mutante <i>tem1-3</i> .....	109
3.3.- Ciclo celular del doble mutante <i>cdc10-11 cdc15-1</i> .....	110
3.4.- ¿Qué ocurre con la célula madre?.....	111
4.- EL FINAL DE LA MITOSIS.....	114
5.- IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR DONDE SE ENCUENTRA INVOLUCRADA Cdc15p.....	117
6.- HOMÓLOGOS DEL GEN <i>CDC15</i> EN OTROS ORGANISMOS.....	118
<b>CONCLUSIONES</b> .....	121
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	123

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina.
<b>APC</b>	<i>Anaphase Promoting Complex</i> (complejo promotor de la anafase).
<b>BCIP</b>	<i>Bromo Chloro Indolil Phosphate</i> (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).
<b>C</b>	Citosina.
<b>cAMP</b>	Adenosín monofosfato cíclico.
<b>CDC</b>	<i>Cell Division Cycle</i> (ciclo de división celular).
<b>cels</b>	Células.
<b>col</b>	Colaboradores.
<b>DNA</b>	<i>Deoxiribonuceotic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico).
<b>DO</b>	Densidad Óptica.
<b>EDTA</b>	<i>Etilen DiamineTetraacetic Acid</i> (ácido etilendiaminotetracético).
<b>EMBL</b>	<i>European Molecular Biology Laboratories</i> .
<b>EMS</b>	Etil-Metano-Sulfonato.
<b>5-FOA</b>	Ácido 5-fluoroorótico.
<b>G</b>	Guanina.
<b>GAP</b>	<i>GTPase Activating Protein</i> (proteína activadora de la función GTPasa).
<b>GDP</b>	Guanosín Difosfato.
<b>GEF</b>	<i>GDP-GTP Exchanging Factor</i> (proteína intercambiadora de GDP por GTP).
<b>GPI</b>	<i>GlycoPhosphatidyl Inositol</i> (glucosilfosfatidil inositol).
<b>GST</b>	Glutation-S-Transferasa.
<b>GTP</b>	Guanosín Trifosfato.
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-Tiogalactopiranósido.
<b>kb</b>	Kilobase.
<b>MAP</b>	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activable por mitógenos).
<b>min</b>	Minutos.
<b>MPKK</b>	Proteína quinasa de una proteína MAP.
<b>MPKKK</b>	Proteína quinasa de una MPKK.
<b>M<sub>w</sub></b>	Peso molecular.
<b>PAK</b>	<i>p21-Cdc42 Activated Kinase</i> (proteína quinasa activada por Cdc42p).
<b>pb</b>	Par de Bases.
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (tampón fosfato salino isotónico).
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa).
<b>(p/v)</b>	(Peso/Volumen).
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico).
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto.
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico.
<b>SKB</b>	SmithKline Beecham.
<b>SPB</b>	<i>Spindle Pole Body</i> (cuerpo polar del huso acromático).
<b>T</b>	Timina.
<b>(v/v)</b>	(Volumen/Volumen).
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido.
<b>YNB</b>	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (nitrógeno base de levaduras).





## INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* despertó temprano interés debido a su utilidad en la producción de vino y cerveza. A comienzos de este siglo, el hallazgo de que para la fermentación alcohólica era suficiente con un extracto de este microorganismo, lo que en definitiva condujo al descubrimiento de las enzimas, revolucionó la utilización de esta levadura y la lanzó como modelo de organismo experimental, hecho que se vio favorecido por su sencillo manejo y el interés derivado de poseer una organización celular eucariótica.

Con el paso de los años, fueron apareciendo otros organismos con cualidades más atractivas para los investigadores; así, se comenzó a trabajar con *Candida* debido a su carácter patógeno, o con *Pichia* debido a las ventajas que presenta a la hora de producir proteínas heterólogas de interés. Pero, la reciente secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae*, coloca de nuevo a este microorganismo en el centro de atención como modelo de investigación básica (Botstein y col., 1997).

En nuestro laboratorio, estamos interesados en diferentes aspectos del ciclo celular y la morfogénesis de la célula eucariótica. Atendiendo a las razones anteriores, *Saccharomyces cerevisiae* se presenta como el organismo apropiado para el desarrollo de nuestros estudios.

### 1. CICLO BIOLÓGICO DE *S. cerevisiae*.

*Saccharomyces* dispone de dos posibilidades a la hora de abordar su ciclo biológico: primero, presenta un ciclo de reproducción vegetativo, a través del cual una célula se divide dando lugar a dos células iguales y, segundo, un ciclo sexual, por el cual dos células haploides de tipo sexual opuesto se conjugan dando lugar a una célula diploide, que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo. El ciclo biológico se cierra cuando, bajo determinadas condiciones tales como el ayuno de nitrógeno, las células diploides llevan a cabo un proceso meiótico que origina la aparición de cuatro esporas haploides.

A un ciclo biológico como el descrito se le conoce como ciclo heterotálico, siendo característico de las cepas comúnmente usadas en los laboratorios. Sin embargo, en la naturaleza, las cepas de *Saccharomyces* habitualmente poseen un ciclo biológico denominado homotálico, gracias al cual una célula haploide puede cambiar su tipo sexual, facilitando el proceso de conjugación y determinando que, generalmente, en el ambiente natural encontremos cepas diploides o poliploides (Nasmyth, 1983; Amon, 1996).

#### 1.1. CICLO VEGETATIVO.

*Saccharomyces*, a diferencia de la mayoría de los organismos eucarióticos, se divide por gemación (Glotzer, 1997); es decir, a partir de una célula madre comienza a desarrollarse una célula hija o yema, que va creciendo hasta alcanzar un tamaño similar al de la madre. En este momento tiene lugar la septación y separación celular. Este progreso morfológico de la

yema está acompañado por una serie de acontecimientos nucleares de suma importancia que van a determinar la duplicación y segregación del material genético.

El ciclo celular se puede dividir en dos grandes etapas (figura 1): la interfase y la mitosis.

- La mitosis, donde tiene lugar la división del material genético, se compone de cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase, concluyendo con la formación de un tabique o septo entre la célula madre y la hija que materializa la división y posterior separación celular. *Saccharomyces* presenta diferencias importantes con respecto a la mitosis de otras células eucarióticas: no desorganiza la doble membrana nuclear favoreciendo la escasa condensación de sus cromosomas y permitiendo que, al contrario que en otras células eucarióticas, éstos sean invisibles.

- En la interfase se distinguen, a su vez, varias fases: existen dos etapas de aparente transición llamadas G1 y G2, separadas por una fase S o de síntesis, en la que tiene lugar la duplicación del material genético, requisito previo para la división celular. En las fases G1 y G2 ocurren procesos trascendentales para la célula como son: el incremento en tamaño, la generación de toda la maquinaria subcelular, etc., pero entre ellos, cabe remarcar un proceso llamado punto *START*. El punto *START* es un punto de control del ciclo celular que acontece en los últimos estadios de la fase G1. Una vez superado dicho punto de control, la célula se ve irremisiblemente abocada a realizar un ciclo completo de división mitótica. Cuando el ciclo celular discurre a través del punto *START*, tiene lugar la duplicación del cuerpo polar del huso SPB (análogo al centrosoma en eucariotas superiores) y se inicia la emergencia de la célula hija, que continuará creciendo a lo largo de toda la fase S.

## 1.2. CICLO SEXUAL.

*Saccharomyces* presenta dos tipos celulares sexualmente opuestos  $\alpha$  y  $a$ , determinados por la expresión de los genes del locus *MAT*. Las células de cada tipo sexual son capaces de secretar al medio un pequeño polipéptido llamado factor  $a$  y factor  $\alpha$ , respectivamente. Cuando las células de cada tipo sexual detectan en el medio la presencia del factor del tipo sexual opuesto manifiestan las siguientes reacciones:

- Una que afecta al ciclo celular, provocando su detención en la fase G1, previamente al punto *START*.

- La otra afecta a la morfología celular, ya que se desencadenan una serie de respuestas morfogenéticas que originan el crecimiento de la célula hacia la fuente de la feromona. Todo este proceso morfogenético se materializa en la transformación de las células ovaladas en células con forma de pera, comúnmente conocidas como *shmoos*. Cuando, a través de las prolongaciones recién formadas, dos *shmoos* se ponen en contacto, tiene lugar la fusión celular y la cariogénesis, hecho que determina la aparición de un núcleo diploide, el cual se coloca en la yema que comienza a crecer en el istmo entre las células conjugativas. Cuando la yema se independiza, comienza una nueva serie de ciclos celulares, pero ya con un núcleo diploide.

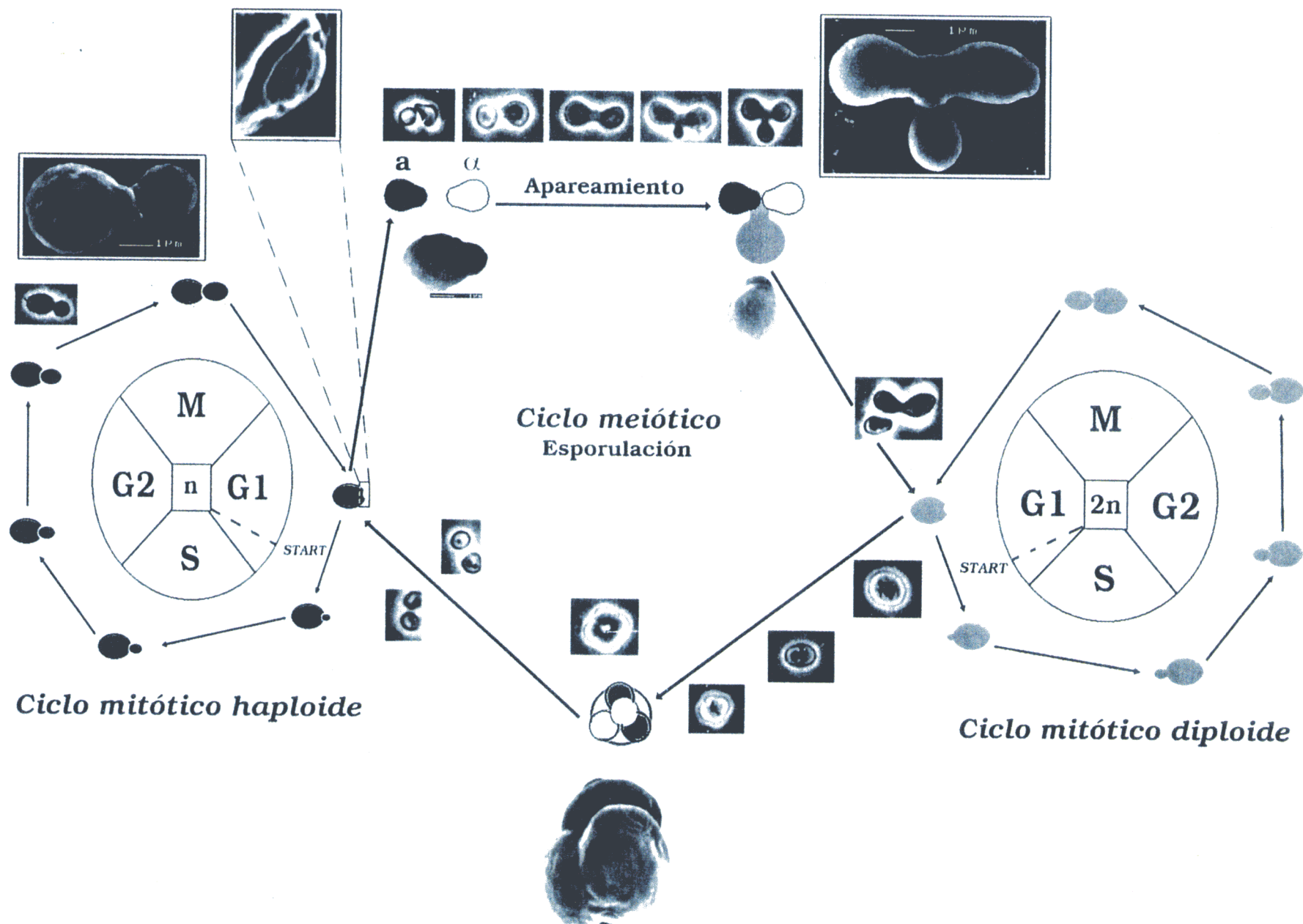
El mecanismo molecular que determina el desarrollo de las respuestas, tanto morfogenéticas como de parada del ciclo celular, ha sido profundamente estudiado. Existen receptores transmembranales codificados por los genes *STE2* en cepas *MATa* y *STE3* en cepas *MATα*, que al unir la feromona, sufren un cambio conformacional, posibilitando la interacción con una proteína G heterotrimérica (Whiteway y col., 1994; Whiteway y col., 1995), disociándola y permitiendo la asociación de las subunidades  $\beta\gamma$  con las proteínas Ste20p y Ste5p, lo que determina su activación (Leberer y col., 1997). Ste5p actúa como molécula aglutinadora de un conjunto de proteínas que conforman una ruta de transducción de señales conocida como ruta de apareamiento o de *mating* (Printen y Sprague, 1994; Elion, 1995; Leberer y col., 1997) e integrada por Ste11p (MPKKK), Ste7p (MPKK) y las MAP quinasas, parcialmente redundantes, Fus3p y Kss1p (Courscherne y col., 1989; Elion y col., 1990; Crews y col., 1992), que a través del factor transcripcional Ste12p (Elion y col., 1993; Printen y Sprague, 1994), son responsables de la activación de la transcripción de genes implicados en la respuesta morfogenética de *mating*. Fus3p también es capaz de activar a Far1p (Peter y col., 1993), responsable de la detención del ciclo celular en G1, por inactivación del complejo Cdc28p unido a ciclinas de la fase G1.

Ste20p, quinasa de la familia PAK, cuando está activada, además de con Cdc42p, es capaz de interaccionar con Bem1p (Leeuw y col., 1995). Bem1p interacciona con el citoesqueleto de actina, lo que la implica en la polarización del crecimiento celular hacia el lugar de recepción de la señal responsable del desencadenamiento de la cascada. Para la polarización del crecimiento y la consiguiente formación del *shmoo*, también es esencial la proteína Spa2p (Gehring y Snyder, 1990), aunque se desconoce su mecanismo de acción.

### 1.3. DESARROLLO PSEUDOHIFAL EN *Saccharomyces*.

Algunas cepas diploides de *Saccharomyces*, bajo condiciones de ayuno de nitrógeno en medio sólido, pueden desarrollar una transición dimórfica y mostrar un patrón pseudohifal de crecimiento (Gimeno y col., 1992). En cepas haploides se ha descrito un fenómeno paralelo denominado crecimiento invasivo. En ambos fenómenos se hallan implicados parte de los componentes de la ruta de *mating* (Cdc42p, Ste20p, Ste11p, Ste7p, Ste12p), recientemente, han aparecido trabajos que indican que la MAP quinasa implicada puede ser Kss1p (Madhani y col., 1997). Sin embargo, la proteína aglutinante que actuaría en lugar de Ste5p, permanece sin ser determinada (Roberts y Fink, 1994; Leberer y col., 1997).

El crecimiento invasivo de las cepas haploides y el desarrollo pseudohifal de las cepas diploides, presentan múltiples similitudes como son: la capacidad de penetrar en el agar, la maquinaria bioquímica y la dependencia de las señales de polaridad. También muestran algunas diferencias como: la capacidad de formar filamentos en medio rico por parte de las cepas haploides, o la diferente morfología tanto colonial como celular; las células de las cepas haploides cuando filamentan mantienen su forma ovalada, mientras que las diploides sufren un alargamiento. Además, las cepas diploides extienden sus filamentos alrededor de las colonias, mientras las haploides presentan el desarrollo filamentoso por debajo de la colonia (Radclyffe y Fink, 1994). Estos autores, principalmente debido a que ambos procesos comparten la misma maquinaria bioquímica, explican el crecimiento pseudohifal y el crecimiento invasivo como diferentes manifestaciones de un mismo proceso (Radclyffe y Fink, 1994).

Figura 1: Ciclo biológico de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 1.4. MUTANTES DE CICLO CELULAR O MUTANTES *cdc* (*Cell Division Cycle*).

Los mutantes *cdc* de *S. cerevisiae* fueron aislados por Hartwell (Culotti y Hartwell, 1971; Hartwell, 1971a; 1971b). Bajo esta denominación se recoge a todas aquellas estirpes mutantes que manifiestan defectos en algún estadio específico del ciclo celular (Hartwell, 1974). La mutación *cdc* suele afectar a una función esencial para la progresión a través del ciclo, por lo que la mayoría de los mutantes *cdc* estudiados muestran un bloqueo total de éste (Pringle y Hartwell, 1981). La parada característica del ciclo celular que manifiestan los mutantes *cdc*, les convierte en una valiosa herramienta para el estudio del ciclo celular. En total, se dispone de unos cincuenta mutantes de ciclo celular, cuyos puntos de parada se encuentran repartidos a lo largo de todo el ciclo (Pringle y Hartwell, 1981).

#### 1.5. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN *S. cerevisiae*.

El ciclo celular se halla finamente regulado, tanto en su progresión como en el control de su correcto desarrollo. La importancia de la regulación del ciclo celular es indiscutible cuando se piensa en los procesos que determina: la división y segregación del genoma, la coordinación de la división celular con el ciclo nuclear, la decisión celular de comenzar un proceso proliferativo o un proceso conjugativo, etc.

Otro elemento a resaltar, en cuanto a la regulación del ciclo celular, es la importancia de la coordinación que ha de existir entre éste y los diferentes eventos morfogenéticos, ya que esta coordinación es esencial para la correcta conclusión del ciclo biológico de cualquier organismo.

##### 1.5.1. Progresión a través del ciclo celular.

El máximo responsable de la progresión del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* es la proteína quinasa Cdc28p (Johnston y col., 1977; Lörincz y Reed, 1984), la cual, a su vez, es regulada por la interacción con una serie de proteínas de expresión cíclica llamadas ciclinas (Wittenberg y Reed, 1988). Cdc28p, unido a las diferentes ciclinas, es capaz de fosforilar sustratos específicos en cada periodo del ciclo celular (Reed, 1992), determinando los procesos característicos de cada etapa.

Las ciclinas se dividen en dos grandes grupos, de acuerdo con el momento del ciclo en que se expresan: ciclinas G1 (Cln1p, Cln2p, Cln3p, Clb5p, Clb6p, Hcs26p) (Cross, 1988; Nash y col., 1988; Hadwiger y col., 1989; Epstein y Cross, 1992; Ogas y col., 1991; Kühne y Linder, 1993) y ciclinas G2 (Clb1p, Clb2p, Clb3p, Clb4p) (Ghiara y col., 1991; Surana y col., 1991; Fich y col., 1992).

La hipótesis propuesta para el mecanismo de acción de las ciclinas G1 (Cln1p, Cln2p y Cln3p), la encontramos en la esencialidad de la interacción de éstas con Cdc28p para superar el punto *START* (Lew y Reed, 1992; Cross, 1995; Nasmyth, 1996). Además, la activación de Cdc28p al unirse a las ciclinas Cln1, 2 y 3p determina un importante aumento en la expresión de las mismas (Cross y Tinkelenberg, 1991; Dirick y col., 1991). *CLN3*, a diferencia del resto,

se expresa a lo largo de todo el ciclo y, a su producto se le atribuye la responsabilidad, al menos en la célula madre, de catalizar el proceso de activación del complejo quinasa cuando la célula está dispuesta para acometer el punto *START* (Lew y Reed, 1992). Sin embargo, en la célula hija las responsables parecen ser Cln1p y Cln2p (Lew y col., 1992; Lew y Reed, 1992; Cross, 1995). La activación de Cdc28p por las ciclinas en G1 determina, por un lado, la polarización del citoesqueleto de actina en el lugar de emergencia de la yema (Lew y Reed, 1993), estadio previo a la emergencia de la misma; por otro lado, determina la división del cuerpo polar del huso (SPB) y el inicio de la replicación del genoma. También está descrito, que dicha interacción, es capaz de activar la proteína quinasa Pkc1p (Gray y col., 1997) implicada, entre otros procesos, en el crecimiento polarizado que determina la emergencia de la yema (Zarzov y col., 1996; Gray y col., 1997).

Dentro de las ciclinas B se pueden distinguir dos subgrupos, de acuerdo con el momento del ciclo celular en que actúan:

- Clb5p y Clb6p son imprescindibles para la progresión a través de la fase S del ciclo celular (Bueno y col., 1991; Lew y Reed, 1992; Cross, 1995).

- Clb1p y Clb2p aparecen en la fase S y tienen su mayor expresión transcripcional en la fase G2/M; ambas se unen a Cdc28p activándola y permitiendo el paso a través de la fase M (Ghiara y col., 1991; Surana y col., 1991). Para completar los últimos estadios de la mitosis y más concretamente el paso de la anafase a la telofase, es necesario que se desacople el complejo Cdc28p-Clb2p (Surana y col., 1993); lo cual, además, determina la polarización del citoesqueleto de actina a la zona del futuro septo, proceso necesario para que se lleve a cabo la septación y separación celular con la que concluye el ciclo celular (Lew y Reed, 1993).

La descripción del funcionamiento de la ciclinas, realizada anteriormente, puede hacer pensar que la actuación de cada uno de sus grupos se encuentra circunscrita a momentos discretos a lo largo del ciclo celular; sin embargo, existen evidencias sobre la influencia que unos tipos de ciclinas ejercen sobre la actuación de los otros. Así, la transcripción de las ciclinas G2 depende de la activación de las ciclinas G1 (Epstein y Cross, 1992); las ciclinas G1, cuando están unidas a Cdc28p, determinan la inactivación de Sic1p, que es un inhibidor de la actividad quinasa de Cdc28p-Clb5p y Cdc28p-Clb6p y, por tanto, se produce la entrada y progresión por la fase S (Schwob y col., 1994; Schneider y col., 1996). También está descrito que la actividad Cdc28p-Clb2p inhibe la transcripción de los genes *CLN1* y *CLN2* e induce la degradación de sus productos por ubiquitinación (Amon y col., 1993; Blondel y Mann, 1996).

### 1.5.2. El final de la mitosis.

*Saccharomyces cerevisiae* utiliza una significativa parte de su ciclo celular en la salida de la anafase. La explicación que se ha propuesto a este hecho es que las células, antes de salir de la mitosis y abordar un nuevo ciclo celular, han de comprobar la fidelidad de todos los procesos recientemente realizados.

Clásicamente se ha involucrado a la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, como determinante para la salida de la metafase y en la entrada en la anafase del ciclo celular (Murray y Kirschner, 1989); seguidamente se determinó que la inactivación del complejo era

precisa en la anafase y no en la salida de la metafase (Surana y col., 1993), como postulaban los anteriores autores. En estos trabajos, (Surana y col., 1993), se atribuyó a la proteína quinasa Cdc15p la responsabilidad en la fosforilación del complejo Cdc28p-Clb2p y su consiguiente desactivación y salida del ciclo (figuras 2 y 3).

Posteriormente se clonó y describió a Sic1p como un inhibidor de la actividad Cdc28p-Clb2p (Schwab y col., 1994), el cual, además de la función ya mencionada en la fase G1 del ciclo, desarrolla su función inhibidora sobre el complejo Cdc28p-Clb2p en la anafase mitótica. La mutación en el gen *SIC1* es sintética letal con la mutación en el gen *DBF2*, gen esencial junto con *DBF20* para la salida de mitosis (Toyn y col., 1996), lo que, a juicio de estos autores, podría explicarse si Dbf2p y Sic1p se encuentran en mecanismos paralelos, destinados a producir la desactivación de Cdc28p-Clb2p y la salida de la anafase (figuras 2 y 3).

Recientemente se ha relacionado la salida de la anafase con la función de una serie de proteínas que conforman el llamado ciclosoma o APC (*Anaphase Promoting Complex*), compuesto por, al menos, siete proteínas entre las que se encuentran: Cdc16p, Cdc23p, Cdc26p, Cdc27p, Apc1p y Cse1p (Zachariae y col., 1996). Este complejo multiproteico es capaz de reconocer una secuencia característica del extremo amino terminal de las ciclinas B, denominada *destruction box*, marcándolas para su ubiquitinación (Glutzer y col., 1991) (figuras 2 y 3).

Existen evidencias que indican que el ciclosoma podría ser dirigido hacia el complejo Cdc28p-Clb2p gracias a proteínas como Hct1p (Schwab y col., 1997). Estos mismos autores postulan que otra proteína, Cdc20p, con elevada similitud estructural con Hct1p, podría realizar la misma función, pero con diferente especificidad, marcando para su ubiquitinación y posterior degradación a otros sustratos inhibidores de la progresión del ciclo a través de la fase M, tales como Pds1p. Estos datos se encuentran avalados por el hecho de que los genes *HCT1* y *CDC20* no son esenciales, pero sí sintéticos letales. Esto, añadido a que las mutaciones en las proteínas que configuran el ciclosoma producen la detención del ciclo, lo que implica que su actuación ha de estar mediada por otras proteínas además de por Hct1p (Schwab y col., 1997; Hoyt, 1997).

En la figura 2 se muestra un esquema de los mecanismos implicados en la progresión del ciclo celular y en la figura 3 se ilustran las diferentes hipótesis propuestas y mencionadas en los párrafos anteriores, sobre la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p y la progresión a través de la anafase.

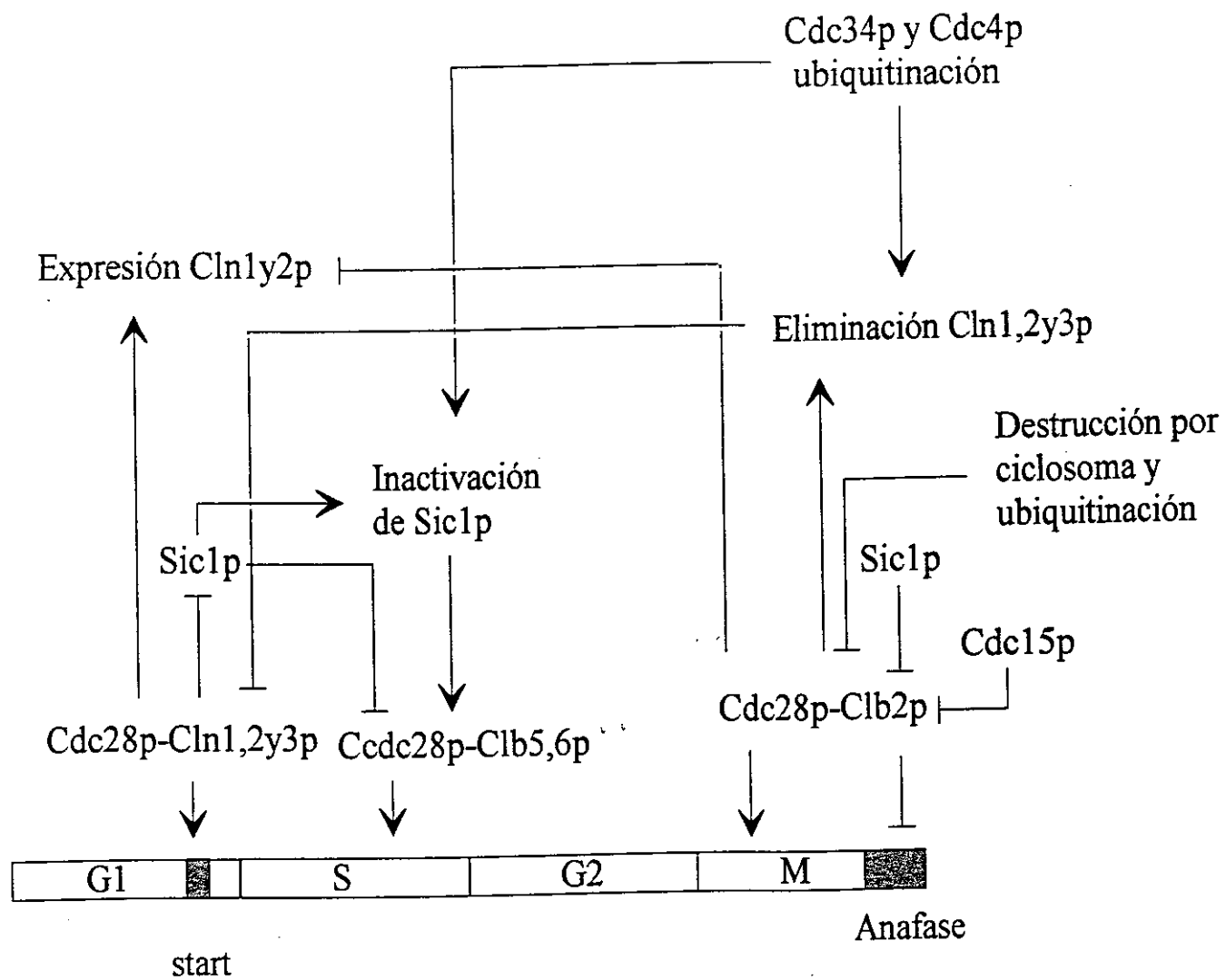
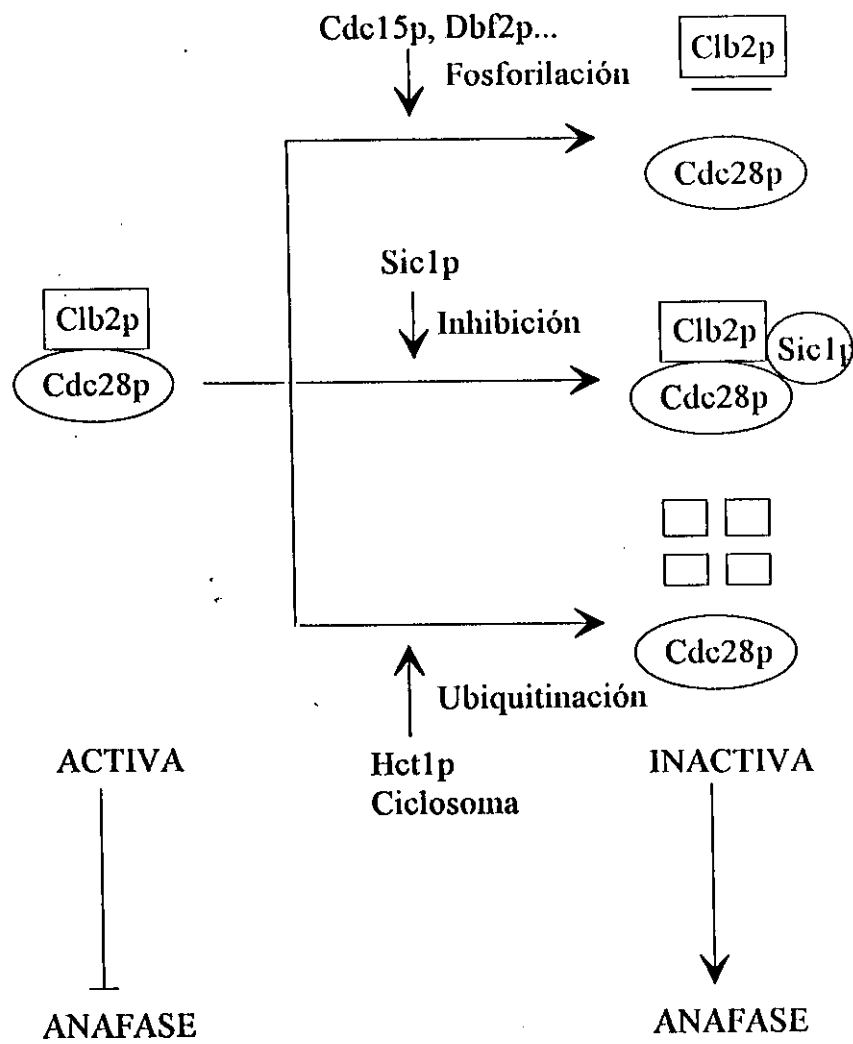


Figura 2: Mecanismos y componentes implicados en la progresión a través del ciclo celular.





**Figura 3:** Diferentes hipótesis o posibilidades para la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p y, por tanto, para la progresión del ciclo celular a través de la anafase.

### 1.5.3. Mecanismos de control del ciclo celular.

Como hemos visto hasta ahora, el ciclo celular se compone de una colección de procesos, altamente ordenados y regulados, cuyo resultado es la duplicación de la célula. El enfoque actual en la investigación del ciclo celular, se organiza en torno al conocimiento de la coordinación de todo el conjunto de procesos que lo integran. La perfecta coordinación de todos los eventos del ciclo permite que, cada uno de ellos, pueda realizarse en el momento y orden precisos.

Clásicamente se atribuía el orden del ciclo celular a un “reloj biológico” intrínseco a las células (Hartwell, 1971a; Hartwell y col., 1974), encargado de determinar el momento del inicio de cada proceso del ciclo. Actualmente, esta idea se ha depurado significativamente, llegándose hasta la propuesta de un ciclo celular secuencial, en el cual, para que un proceso concreto tenga lugar, previamente ha de concluirse apropiadamente el anterior (Hartwell y Weinert, 1989; Elledge, 1996). En este razonamiento se halla implícita la idea de *checkpoint* o punto de control del ciclo celular, el cual podríamos definir como: “mecanismo bioquímico encargado de asegurar el acontecimiento de un proceso, a la correcta consecución de otro previo en el ciclo celular” (Elledge, 1996). De acuerdo con los precedentes expuestos, un *checkpoint* es un mecanismo capaz de detectar una disfunción en un proceso trascendental para la célula y detener el ciclo celular, procurando el tiempo necesario para que ésta sea subsanada por los sistemas de reparación celular. De este planteamiento se deduce que los *checkpoints* se componen de tres partes (Murray, 1995):

- Sistema detector del defecto.
- Sistema transmisor de la señal, desde el detector hasta la maquinaria de progresión del ciclo.
- Sistema efector: encargado de detener el ciclo celular y de la transcripción de genes destinados a reparar la disfunción detectada.

La detención del ciclo celular determinada por un *checkpoint* puede ser definitiva -hasta que se solucione la anomalía responsable de la activación- o puede, simplemente, determinar un retraso en el acontecimiento del siguiente proceso (Hartwell y Weinert, 1989; Toczyski y col., 1997), lo que implica un paulatino decaimiento en la efectividad de la maquinaria del *checkpoint* encargada de la detención del ciclo.

En *S. cerevisiae* se han descrito y caracterizado en profundidad tres puntos de control del ciclo celular, que están encargados de señalar: la presencia de daño físico en el DNA durante la replicación, la incorrecta duplicación del cuerpo polar del huso y la incorrecta duplicación del DNA. Recientemente, han aparecido trabajos que proponen la existencia de otros *checkpoints* encargados de controlar el proceso de emergencia de la yema (Lew y Reed, 1995) y el inicio de la replicación del DNA (Toyn y col., 1995). Sin embargo, los mecanismos bioquímicos implicados en estos dos últimos controles no se encuentran, en la actualidad, tan bien definidos y descritos como en los tres primeros.

Según Murray (1995) podrían existir otros puntos de control, ya que, en algunos casos, la parada del ciclo celular determinada por una mutación *cdc* puede enmascarar un *checkpoint*.

Esta aseveración se basa en que la parada del ciclo celular causada por un mutante *cdc* puede deberse a tres causas: (i) la mutación *cdc* produce una lesión que es detectada por un *checkpoint* que detiene el ciclo celular, (ii) la mutación *cdc* puede activar constitutivamente a un *checkpoint* y (iii) la mutación *cdc* inactiva un proceso esencial para la progresión del ciclo celular. En los dos primeros casos la mutación *cdc* está enmascarando a un *checkpoint* como responsable de la detención del ciclo celular. Elledge (1996) participa de este punto de vista, puesto que él implica a mecanismos celulares de tipo *checkpoint* en procesos tales como: la detección de células de tipo sexual opuesto, la coordinación del ciclo celular con el tamaño de la célula, la restricción de la duplicación del DNA a una vez por ciclo, y la correlación de la división del núcleo al proceso de gemación.

#### 1.5.3.1. *Checkpoint* de daño en el DNA y de replicación del DNA

En respuesta a un DNA dañado o deficientemente replicado, las células de los distintos organismos inducen una serie de respuestas destinadas a reparar los desperfectos. Entre ellas cabe destacar la parada del ciclo celular en G1, S o G2, así como el incremento en la transcripción de genes implicados en funciones de reparación y replicación del DNA (Hartwell y Weinert, 1989).

El gen *CDC13* codifica una proteína que se une a los telómeros de los cromosomas, llevando a cabo una función protectora de los mismos, de modo que un mutante *cdc13* termosensible acumula DNA monocatenario en los telómeros de sus cromosomas, deteniendo el ciclo celular en la fase G2 (Garbik y col., 1995). Se han encontrado cuatro genes (*RAD9*, *RAD17*, *RAD24*, *MEC1*) necesarios para la parada del ciclo celular en G2 de los mutantes *cdc13* (Weinert y col., 1994; Lydall y Weinert, 1995). Rad17p presenta homología con exonucleasas, lo cual hace pensar que puede estar involucrada en modificar el daño producido en el DNA para generar la señal del *checkpoint* (Lydall y Weinert, 1995). Rad24p presenta similitud con proteínas que se unen a DNA monocatenario, lo que la implica en el reconocimiento de la lesión (Griffiths y col., 1995). Pol2p (subunidad  $\epsilon$  de la DNA polimerasa) es la responsable de detectar las anomalías en la replicación del DNA durante la fase S (Navas y col., 1995).

En el sistema de transducción de la señal de daño físico en el DNA y de deficiente replicación del mismo, se hallan implicadas las proteínas Mec1p y Rad53p. Mec1p es una proteína de la familia de las fosfoinosítido quinasas, Rad53p es otra quinasa, que es fosforilada y activada en respuesta a daño físico en el DNA. La activación de Rad53p es dependiente de Pol2p, Rad9p y Mec1p, lo que la coloca por debajo de todas ellas en la ruta de transducción de la señal (Navas y col., 1996; Sánchez, 1996; Sun y col., 1996).

Los efectores de la ruta han de desempeñar una doble función: desencadenar la transcripción de genes implicados en la reparación de DNA y detener la progresión del ciclo celular. Existe un activador transcripcional llamado Dun1p, que sufre un incremento notable en su actividad, de manera dependiente de Rad53p y de Mec1p, cuando existe una lesión en el DNA. Dun1p, junto con otros activadores transcripcionales similares, activa la transcripción de numerosos genes, cuyos productos son requeridos para la reparación del DNA (Navas y col., 1996). El mejor candidato para ejecutar la parada del ciclo en la fase G2 del ciclo celular es la proteína Pds1p, ya que los mutantes en el gen *PDS1* no detienen el ciclo celular en respuesta a

la radiación  $\gamma$  o a la presencia de mutaciones *cdc13* (Yamamoto y col., 1996), si bien el mecanismo por el cual Pds1p detiene el ciclo celular permanece sin ser determinado.

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, el mecanismo de estos dos *checkpoints* es paralelo al exhibido por *S. cerevisiae*. Sin embargo, al contrario que en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* se encuentra perfectamente definido que la detención del ciclo celular, se lleva a cabo a través de la inactivación de Cdc2p (Murray, 1995; Elledge, 1996; Nurse, 1997), homóloga de la proteína Cdc28p de *S. cerevisiae*.

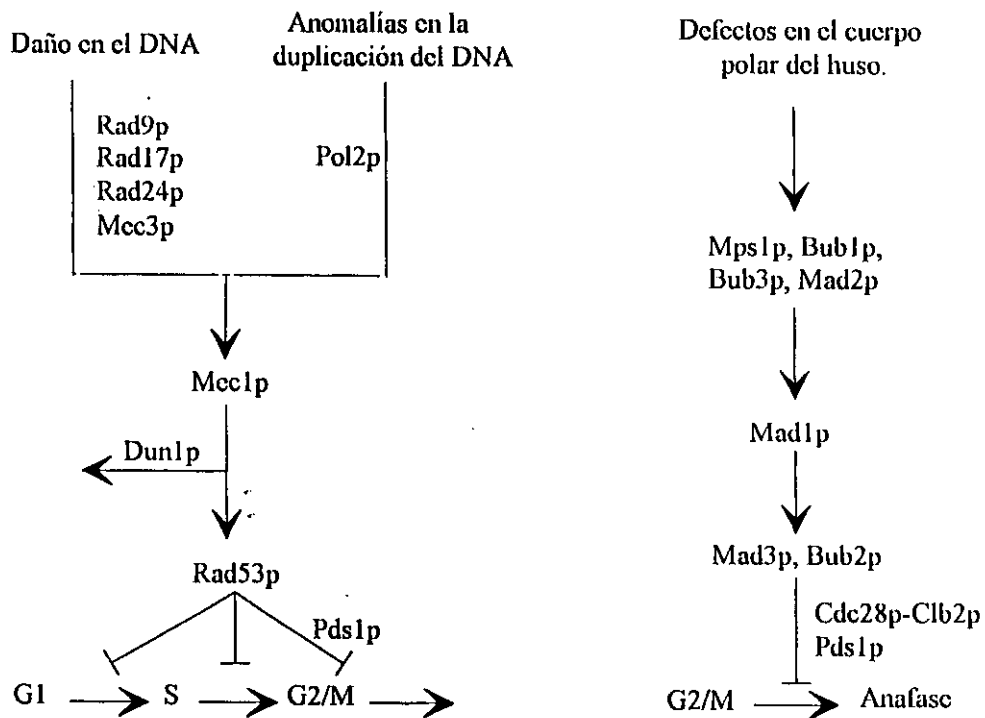
### 1.5.3.2. *Checkpoint* del cuerpo polar del huso.

El cuerpo polar del huso, equivalente al centrosoma en eucariotas superiores, comienza a duplicarse al final de la fase G1, cuando la célula supera el punto *START*. Estos cuerpos polares emiten unas fibras microtubulares a las que, a través del cinetocoro, se anclan los centrómeros de los cromosomas. Cuando los cromosomas se hallan dispuestos en la placa metafásica, el sistema del cuerpo polar del huso se encarga de transportar una cromátida de cada cromosoma a cada una de las células.

Existe un *checkpoint* encargado de prevenir la entrada en la anafase hasta que todos los procesos descritos anteriormente hayan sido llevados a cabo de forma correcta (Elledge, 1996). Este mecanismo, se supone, que es capaz de detectar diferentes fenómenos como: la concentración de tubulina libre en el citoplasma, la unión de los microtúbulos al cinetocoro y la tensión de los microtúbulos en el cinetocoro. Cualquiera de ellos puede aportar información acerca de anomalías en el funcionamiento del proceso de la segregación cromosómica (Elledge, 1996).

Las proteínas Mad1p, Mad2p, Mad3p, (*Mitosis Arrest Deffect*) (Hereford, 1974) y Bub1p, Bub2p y Bub3p (*Budding Uninhibited by Benomyl*) (Hoyt y col., 1991) no son esenciales, pero su ausencia, cuando las células están en presencia de inhibidores de los microtúbulos, produce aberraciones en la mitosis y muerte celular. Estas proteínas, junto con Mps1p (Winey y col., 1991), son precisas para que se retrase la anafase en células que portan cromosomas con los centrómeros mutados. Existen resultados que indican que Bub1p, Bub3p, Mad2p y Mps1p podrían formar un complejo proteico en el cinetocoro y ser las responsables de señalar cualquier anomalía en su funcionamiento (Rudner y Murray, 1996). El complejo se fosforila como resultado de anomalías en el cinetocoro, activando por fosforilación a Mad1p que, a su vez, activa a Mad3p y Bub2p. (Rudner y Murray, 1996).

Se postula que Cdc28p-Clb2p puede verse involucrada en el mecanismo a través del cual se detiene el ciclo celular en la metafase. Así, la activación del *checkpoint* actuaría sobre el complejo Cdc28p-Clb2p, a través de un mecanismo en el que se propone al inhibidor del ciclo celular Pds1p, como el responsable de la actuación sobre Cdc28p-Clb2p y la consecuente parada del ciclo celular al final de la metafase (Rudner y Murray, 1996).



**Figura 4:** En el esquema de la izquierda se representa el mecanismo y los componentes de los *checkpoints* de daño en el DNA y de duplicación del mismo. En el esquema de la derecha se representa el *checkpoint* que da cuenta de la correcta división de los cromosomas.

## 2. MORFOGÉNESIS Y POLARIDAD DE *S. cerevisiae*.

### 2.1. LA PARED CELULAR.

Las células de *S. cerevisiae* se encuentran cubiertas por una superficie rígida llamada pared celular. La pared celular, además de conferir protección a las células frente a las variaciones de las condiciones del medio, determina la forma celular, lo que le hace ser una pieza clave en la morfogénesis de este organismo.

La pared celular, a pesar de ser una estructura rígida, ha de permitir que ocurran procesos tales como: la emergencia y crecimiento de la yema, la formación de las prolongaciones del proceso de conjugación o *shmoo*s, la separación celular, etc. La clave para resolver esta aparente paradoja hay que buscarla en la fina regulación que presentan los mecanismos biosintéticos y degradativos en cada uno de los procesos en que la pared se ve implicada (Cabib y col., 1997).

#### 2.1.1. Composición y arquitectura de la pared celular.

La pared celular de *S. cerevisiae* se encuentra formada, básicamente, por tres tipos de polímeros:  $\beta$ -glucano, quitina y manano. El componente mayoritario de la pared celular es el glucano, que forma un entramado donde se anclan las manoproteínas. La quitina es el componente más escaso, hallándose restringido, casi exclusivamente, al anillo que rodea la zona de septación y a la cicatriz de gemación que deja este proceso en la pared de la célula madre (Horisberger y Volanthen, 1977; Bulawa, 1993; Cid y col., 1995).

El glucano está formado por largas cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces de tipo  $\beta$ -1,3-O-glucosídico. El  $\beta$ -1,3-glucano se caracteriza por su solubilidad en medio alcalino. Hay una pequeña proporción de glucano insoluble en álcali, pero soluble en una solución de ácido acético, formado por cadenas de moléculas de glucosa unidas por enlaces de tipo  $\beta$ -1,6-O-glucosídico. Existe un tercer tipo de glucano, insoluble tanto en soluciones de ácido acético como en soluciones alcalinas, que se encuentra formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,3-O-glucosídicos, cuyo extremo no reductor se une, a través de un enlace  $\beta$ -1,4, al extremo reductor de una cadena de quitina (Kollár y col., 1997).

La quitina está compuesta por monómeros de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina, las cadenas de este compuesto se asocian unas con otras a través de puentes de hidrógeno, formando microfibrillas.

El manano es un polímero compuesto por unidades de manosa, unidas covalentemente a diversas proteínas a través de enlaces O- o N-glicosídicos. También se ha descrito que, a través de una molécula de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol), diferentes manoproteínas se pueden unir, por su extremo carboxilo terminal, a la membrana plasmática (Ferguson, 1991).

En cuanto a la arquitectura, la pared celular se dispone en diferentes capas, una exterior con aspecto fibroso y rica en manoproteínas y otra interior, menos organizada y dividida a su

vez en dos zonas: la más interna y próxima a la membrana celular es rica en proteínas, mientras que la más externa y en contacto con la capa rica en manano, se caracteriza por poseer una elevada proporción de  $\beta$ -1,6-glucano (Klis, 1994; Orlean, 1997). El glucano es el responsable de crear un entramado en el cual se embeben las diferentes manoproteínas, que se encargan no tanto del mantenimiento de la forma de la pared, como de funciones encaminadas hacia el dinamismo y la morfogénesis de la misma.

De acuerdo con la idea de dinamismo de la pared celular es previsible encontrar variaciones importantes en su composición, por ejemplo en el desarrollo de la yema, la cual carece casi completamente de quitina y cuya composición de manoproteínas es diferente a la de las células maduras, permitiendo que tengan lugar la gran cantidad de fenómenos dinámicos precisos para la emergencia y desarrollo de la misma (De Nobel y col., 1991). Otro ejemplo lo encontramos en las proyecciones características del proceso de apareamiento que, además de presentar diferente composición de manoproteínas, poseen un glucano con elevada proporción de enlaces  $\beta$ -1,6 y una cantidad de quitina tres veces superior a la de las células vegetativas (Fleet, 1991; Cid y col., 1995).

La responsabilidad de las variaciones en la pared celular debemos buscarla en la regulación de las enzimas tanto biosintéticas como hidrolíticas de la misma. Sin ánimo de realizar un análisis exhaustivo, entre las enzimas biosintéticas encontramos: Chs1p, Chs2p, Chs3p, Chs4p y Chs5p responsables de la síntesis de la quitina. Chs3p requiere de la actividad de Chs4p y Chs5p para la síntesis de la quitina del anillo de la base de la yema y la proyección del proceso conjugativo y, por su parte, Chs2p parece implicado en la síntesis de quitina en la formación del septo primario. Entre las enzimas implicadas en la síntesis del  $\beta$ -1,3-glucano encontramos a Fks1p y Fks2p (Foor y col., 1994; Castro y col., 1995) y en la del  $\beta$ -1,6-glucano a los productos de los genes *KRE 1,5,6,9,11* (Boone y col., 1990; Brown y col., 1993). Entre las enzimas hidrolíticas están las glucanasas (endo y exoglucanasas), que actúan sobre el esqueleto del  $\beta$ -glucano en los procesos de gemación, conjugación y crecimiento de la pared (Nombela y col., 1988; Fleet, 1991; Larriba y col., 1995; Orlean, 1997). Existe también en la pared una actividad quitinasa, fundamental para la separación de la célula hija tras la septación (Kuranda y Robbins, 1991).

### 2.1.2. Mutantes líticos.

Para abordar el estudio de la pared celular se han utilizado numerosas aproximaciones experimentales, tales como: el empleo de antibióticos específicos frente a algún componente de la pared, el estudio de mutantes hipersensibles al blanco de calcoflúor y por tanto afectados en la síntesis de la quitina, el estudio de mutantes resistentes a la toxina *killer* y por tanto afectados en la síntesis del  $\beta$ -glucano (Brown y col., 1993) y el aislamiento y estudio de productos de secreción de protoplastos (Pardo y col., 1998). Sin embargo, la aproximación más clásica para el estudio de la pared ha sido el análisis de aquellos mutantes cuya característica fenotípica es producir la lisis de las células. En cuanto al fenómeno lítico, se pueden distinguir dos tipos de mutantes: aquellos en los que el defecto lítico es complementable mediante la estabilización osmótica del medio de cultivo y aquellos en los que la estabilización osmótica no remedia el defecto lítico (Torres y col., 1991). El que un mutante lítico sea osmorremediable se puede explicar gracias a que la función protectora de una pared defectuosa es compensada por una mayor presión osmótica del medio; éste es el caso del

mutante lítico *lyt2* (mutación en el gen *SLT2* que codifica una proteína quinasa de la familia MAP) (Torres y col., 1991), así como de todos los mutantes de esta ruta de transducción de señales requerida para la integridad celular a elevada temperatura (Martín y col., 1993; Errede y col., 1995). Existe otro grupo de mutantes líticos cuyo defecto no es suprimido por la presencia de estabilizadores osmóticos, lo que indica que la mutación afecta a algún proceso celular distinto de la integridad de la pared, pero, como efecto secundario, ésta se ve afectada. Por tanto, la causa primaria de la lisis en estos mutantes no hay que buscarla en una determinada disfunción de la capacidad protectora de la pared, este es el caso del mutante *lyt1* (Molero y col., 1993).

## 2.2. MORFOGÉNESIS DE *S. cerevisiae*.

Un amplio campo de estudio, con profundos interrogantes, a pesar de los significativos avances que se están logrando, es el referido al conocimiento de la forma de *S. cerevisiae*: cómo se determina, cómo se genera, los diferentes patrones de desarrollo y las características que éstos confieren a la célula. Básicamente disponemos de dos tipos de herramientas para el estudio de la morfología de un organismo: la primera es la observación del desarrollo normal del organismo a lo largo de su ciclo vital y la segunda se basa en el estudio de aquellos mutantes que muestran una morfología diferente a la habitual (Harold, 1995).

### 2.2.1. Coordinación de la morfogénesis con el ciclo nuclear.

Conjuntando las dos técnicas de estudio enumeradas anteriormente, se ha pretendido conocer cómo las modificaciones que sufre la morfología de una célula de *S. cerevisiae*, es decir, su ciclo morfogenético, está determinado por, o coordinado con el ciclo nuclear.

El abordaje de esta cuestión nos lleva, una vez más, a la proteína quinasa Cdc28p, la cual, además de dirigir la progresión a través del ciclo celular, es la responsable de disparar el inicio de numerosos fenómenos morfogenéticos, coordinándolos con el correspondiente estadio del ciclo celular (Lew y Reed, 1993).

El mecanismo de acción propuesto para esta proteína quinasa se basa en la distinta especificidad que manifiesta, en los distintos momentos del ciclo celular, por las diferentes ciclinas. Así, para la emergencia de la yema al final de la fase G1, es necesario que Cdc28p se encuentre activado por la unión de las ciclinas Cln1p, Cln2p y Cln3p (Lew y Reed, 1993; Gray y col., 1997). Del mismo modo, es necesario que Cdc28p esté unido a las ciclinas Clb5p y Clb6p para que ocurra la despolarización del crecimiento de la yema y ésta crezca de modo isotrópico. Por último, al final de la mitosis es necesario que el complejo Cdc28p-Clb2p se inactive, para que se produzca la polarización del crecimiento en la zona del septo (Lew y Reed, 1993).

El mecanismo central de coordinación se encuentra apoyado, además, por otros dispositivos encargados de asegurar que todos los procesos ocurran de manera ordenada y correcta. A estos mecanismos se les conoce por el nombre de *checkpoints* (ver apartado 1.5.3. de este capítulo). Otra ayuda al sistema principal de control se manifiesta por la existencia de proteínas inhibitoras de la actividad de Cdc28p, tales como Far1p, Pds1p y Sic1p que, sin duda, contribuyen a la perfecta coordinación de los ciclos morfogenético y nuclear.



Una pequeña correlación de los eventos de ambos ciclos se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1:** Sincronización del ciclo nuclear y morfogénico.

<b>FASE DEL CICLO</b>		<b>EVENTOS NUCLEARES</b>	<b>EVENTOS MORFOGENÉTICOS</b>
<b>FINAL DE G1 (START)</b>  Cdc28p unido a Cln1, Cln2p y Cln3p.		-División del SPB.	-Ensamblaje de las septinas en el punto de gemación.  -Polarización de la actina hacia el punto de gemación.  -Emergencia de la yema y crecimiento polarizado de la misma.
<b>FASE S</b>  Cdc28p unido a Clb5p y Clb6p.		-Separación del SPB.  -Replicación del DNA.	-Crecimiento isotrópico de la yema.
<b>FASE G2</b>			-Despolarización de la actina.
<b>FASE M</b>  Cdc28p Clb2p.	<b>Anafase</b>  Inactivación Cdc28p.	-Segregación de las cromátidas.  -División del núcleo y migración a la yema.	-Polarización de la actina en la región del septo.  -Formación del septo.  -Separación celular.
<b>FASE G1 (TEMPRANA)</b>		-Migración del SPB frente al próximo punto de polaridad.	-Crecimiento de la célula hija.  -Selección del siguiente punto de polaridad.

### 2.3. LA POLARIDAD CELULAR.

Las células de *S. cerevisiae*, a pesar del aspecto oval y aparentemente sencillo que presentan, se encuentran polarizadas, es decir, disponen de una orientación o, más gráficamente, presentan una disposición asimétrica (Chant, 1996b). *S. cerevisiae* manifiesta su asimetría o su polaridad, en dos momentos del ciclo celular: durante el proceso de conjugación, con la formación de las proyecciones de apareamiento o *shmoo*s y en el proceso de gemación, con la aparición de la yema, siguiendo un patrón determinado y constante.

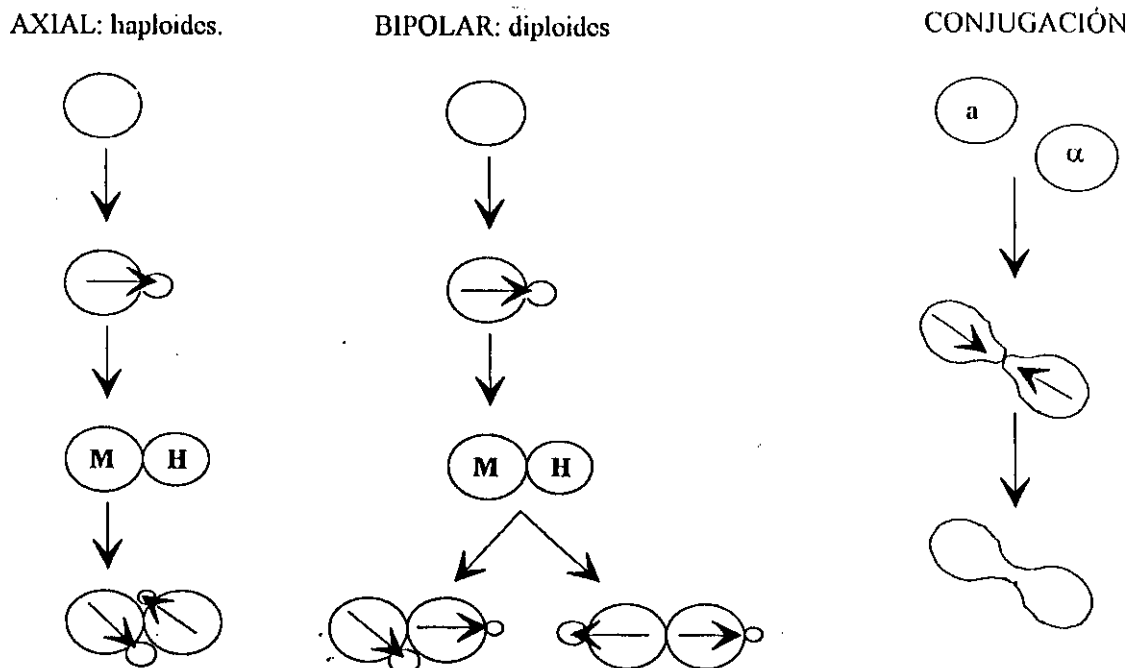
La gemación es una división celular asimétrica, donde la yema crece y la célula madre no. Las células, antes de la emergencia de la yema, sufren un intenso proceso de polarización, gracias al cual, se focalizan todos los componentes de la maquinaria biosintética necesarios para la emergencia y crecimiento de la yema, en un lugar concreto de la superficie de la célula madre. El lugar hacia el que se polariza la maquinaria celular no se elige al azar, sino que existen patrones internos que determinan el lugar preciso donde se ha de dirigir la polaridad celular. En *Saccharomyces* existen dos patrones de polaridad diferentes (Chant y Pringle, 1995):

- Patrón axial. Característico de las células haploides de ambos tipos sexuales, determina que la nueva yema emerja contigua a la cicatriz producida por la gemación de la anterior ronda de división celular o, en el caso de tratarse del primer proceso de gemación que realiza esa célula, la emergencia de la yema será de forma contigua a su cicatriz de nacimiento.

- Patrón bipolar. Característico de cepas diploides, obedece a señales permanentes que marcan los polos de las células y determina que la célula hija gema de forma distal a su cicatriz de nacimiento, mientras que la célula madre puede elegir, bien el polo distal a su última gemación o bien el proximal. Esta elección depende del tiempo que la célula madre haya tardado en abordar el nuevo proceso de gemación y es debido al carácter transitorio de las señales que marcan el polo proximal. Así pues, células que hayan sido sometidas a ayuno, lo que les hace detener el ciclo en la fase G1, eligen para la nueva gemación el polo distal (Roemer y col., 1996).

En el proceso de conjugación, la polarización de las células no es generada por un patrón interno, como en el caso de la gemación, sino que el eje de polaridad es orientado hacia un lugar de la superficie celular, a través del cual, se recogen las señales que indican la proximidad de una célula de tipo sexual opuesto.

Los diferentes patrones de polaridad celular exhibidos por *S. cerevisiae*, se esquematizan en la figura 5.



**Figura 5:** Polaridad celular durante los procesos de gemación y de conjugación. A la izquierda, gemación de haploides (patrón axial) y diploides (patrón bipolar). A la derecha, orientación de la polaridad hacia la célula de tipo sexual opuesto en el proceso de conjugación.

En torno a la polaridad celular hay dos cuestiones clave, alrededor de las cuales se desarrolla gran parte del trabajo en este campo: ¿cómo genera la célula un eje de polaridad de una forma rápida, precisa y programada?, ¿cómo elige la célula la orientación del eje de polaridad? (Chant, 1994). Las respuestas, si bien en numerosos aspectos permanecen sin aclarar, las intentaremos abordar a continuación.

### 2.3.1. ¿Cómo se elige el eje de polaridad celular en el proceso de gemación?

Es decir, ¿cómo se determina el punto hacia el que se ha de dirigir la polaridad celular para generar la nueva gemación? Se han encontrado mutantes que son incapaces de orientar la gemación de acuerdo con los patrones previamente descritos, siendo éste el único proceso afectado ya que el resto de funciones celulares son totalmente normales (Chant, 1994). Este

hallazgo implica a los genes mutados en la elección del correcto sitio de gemación. Entre ellos existen diferentes grupos:

- Grupo 1: en él se recoge a todos aquellos mutantes que presentan un patrón de gemación al azar, son los mutantes en los genes *BUD1/RSR1*, *BUD2* y *BUD5* (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991; Chant y col., 1991; Chant, 1994; Roemer y col., 1996).
- Grupo 2: mutantes que tienen afectado el patrón de polaridad axial, desplazando ésta hacia las señales permanentes de polaridad que residen en los polos, son los mutantes en los genes *BUD3*, *BUD4*, *BUD10/AXL2* y *AXL1* (Chant y Herskowitz, 1991; Sanders y Herskowitz, 1996; Halme y col., 1996; Roemer y col., 1996).
- Grupo 3: mutantes que presentan alteraciones en el patrón de gemación bipolar, pero no en el axial, son los mutantes en los genes *BUD6*, *BUD7*, *BUD8* y *BUD9*. (Zahner y col., 1996).

*BUD1* codifica una proteína con actividad GTPasa, de pequeño tamaño, perteneciente a la familia de las proteínas Ras (Bender y Pringle, 1989). Se localiza en la membrana plasmática y se propone que es activada en el lugar donde va a emerger la yema. La activación se produce gracias a la unión a GTP, determinada por la acción de Bud5p (Michelitch y Chant, 1996), la cual actúa como proteína intercambiadora de GDP por GTP (GEF) (Chant y col., 1991). El ciclo lo cierra Bud2p, que es una proteína GAP, por tanto, capaz de promover la capacidad GTPasa de Bud1p, inactivándola (Park y col., 1993). A este grupo de proteínas, debido a la función crucial en la determinación del lugar de gemación, se le conoce como el sistema general de polaridad.

El gen *BUD3* codifica una proteína que se expresa tanto en células haploides como en diploides, su función es esencial para el establecimiento del patrón axial y totalmente prescindible para el bipolar (Chant, y col., 1995). Por ensayos de inmunofluorescencia, se ha determinado que colocaliza con el doble anillo de septinas en el cuello entre la célula madre y la hija (Chant, y col., 1995), si bien su ubicación, al contrario que las septinas que se ensamblan antes de la emergencia de la yema, no ocurre hasta bien avanzado el crecimiento de la misma (Chant, 1996b). Se ha propuesto que Bud3p participa en la determinación del patrón axial de gemación atrayendo hacia el lugar elegido al sistema general de selección de la polaridad, integrado por las proteínas Bud1p, Bud2p, y Bud5p (Chant, y col., 1995). No obstante, el detalle molecular de la selección del patrón axial de gemación permanece sin esclarecer.

Otras proteínas esenciales para el desarrollo del patrón axial son Bud4p, que colocaliza espacial y temporalmente con Bud3p y Bud10p/Axl2p, proteína transmembranal que colocaliza espacialmente con las dos anteriores, pero aparece previamente y de forma paralela a las septinas (Sanders y Herskowitz, 1996; Halme y col., 1996).

La propuesta actual para el mecanismo de acción de las proteínas Bud3p, Bud4p y Bud10p se basa en que podrían estar involucradas en marcar el sitio para el ensamblaje de las septinas en el siguiente ciclo de división, dirigiéndolas a una localización contigua a ellas, lo que, en definitiva, determina el patrón de polaridad axial y, por ello, la nueva gemación tendría lugar en un emplazamiento contiguo al anterior.

Cabe preguntarse: ¿por qué en las células diploides no se determina el patrón de polaridad axial a pesar de que Bud3p, Bud4p y Bud10p se expresan y se localizan correctamente? La respuesta podríamos encontrarla en la proteína Ax11p, que únicamente se expresa en haploides y es imprescindible para que aparezca el patrón axial. Ax11p es una proteasa implicada en la degradación de las feromonas del proceso de conjugación (Adames y col., 1995) y, se supone, que podría estar implicada, bien en la activación por proteólisis de algún componente necesario para la polaridad axial, o bien, ser la responsable de la degradación de un supresor del patrón axial, lo que enmascararía este patrón en células diploides (Chant, 1996b).

Se ha propuesto que el patrón bipolar típico de células diploides depende de señales permanentes que marcan los polos de las células, es decir, de señales que marcan la región de la última gemación y el extremo opuesto. Se han buscado mutantes que tengan afectado el patrón bipolar de gemación, pero no el axial, intentando localizar genes implicados exclusivamente en el marcaje de los polos y el patrón bipolar. La mutagénesis fue realizada sobre una cepa haploide *bud3*, seleccionándose aquellos mutantes que presentaban un patrón de gemación al azar. Para eliminar los mutantes que tuviesen afectadas las funciones del sistema general de polaridad, es decir, los genes *BUD1*, *BUD2* y *BUD5*, se transformaron los mutantes con el gen *BUD3* y se seleccionaron aquellos que mostraban un patrón axial. Los mutantes así generados resultaron estar afectados en los siguientes genes:

- *BUD2* y *BUD5*. Esto puede querer indicar que los nuevos alelos mutantes generados están afectados, únicamente, en lo referente a la interacción con las señales de polaridad bipolares y no con las axiales. Este hallazgo confiere un interesante carácter modular al sistema general de polaridad, destinado a diferenciar las señales bipolares de las axiales (Zahner y col., 1996).

- *SPA2* y *BN11*. Las mutaciones en ambos genes confieren la pérdida del patrón bipolar, sin afectar el axial, pero no se dispone de explicación para este hecho.

- Por último, se aislaron un grupo de mutantes afectados en cuatro genes no caracterizados: *BUD6*, *BUD7*, *BUD8* y *BUD9*. Estudios preliminares indican que Bud8p podría estar implicado en marcar el polo distal, ya que cepas *bud8* geman por el polo proximal. Bud9p podría estar implicado en marcar el polo distal específicamente en la célula hija (Zahner y col., 1996). Bud6p interacciona con actina y los mutantes *bud6*, además de las alteraciones en el patrón bipolar, presentan otros defectos en la separación nuclear y en la citoquinesis (Amberg y col., 1997).

El estudio del patrón bipolar de gemación, a pesar de los estudios preliminares que se están realizando, permanece aún fuera de nuestro conocimiento, e incluso los resultados aquí mostrados son puestos en tela de juicio por sus autores, aduciendo la imposibilidad de descartar que el defecto observado en el patrón bipolar no sea sino un efecto secundario de la mutación (Zahner y col., 1996).

### 2.3.2. ¿Cómo se instaure el eje de polaridad?

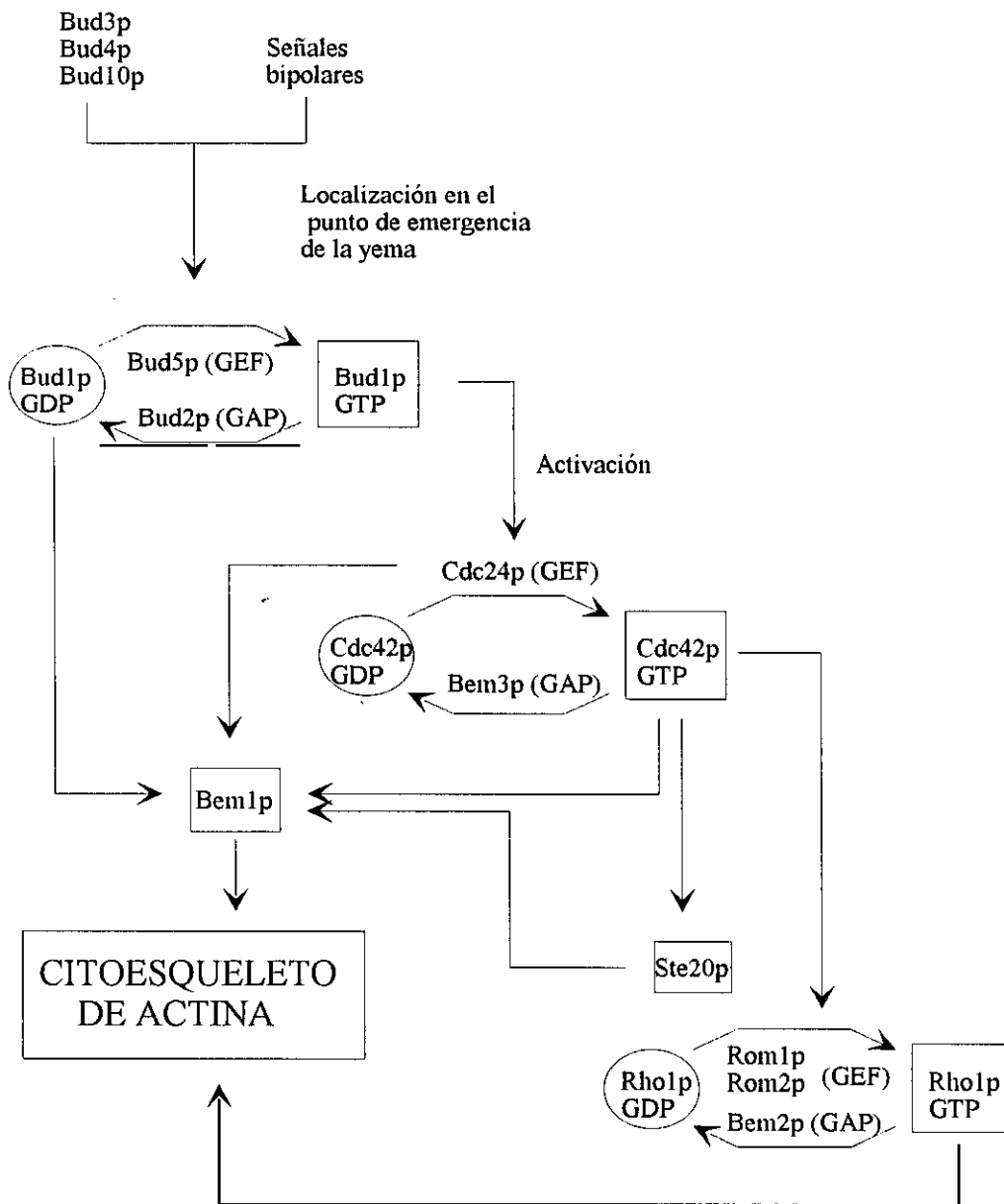
La segunda pregunta que nos planteábamos al comenzar este apartado hace referencia a cómo, una vez elegido el lugar en el que se va a realizar la gemación, se dirige a aquella zona toda la maquinaria celular destinada a realizar el proceso de gemación o de proyección de la estructura de conjugación. En definitiva, cómo se genera y mantiene el eje de polaridad dentro de la célula.

Está descrita la interacción de Bud1p activo, es decir, unido a GTP, con Cdc24p (Park y col., 1997), la cual, además, actúa como factor intercambiador de GDP por GTP (GEF) de la proteína GTPasa de pequeño tamaño Cdc42p (Zheng y col., 1993). Las mutaciones en los genes *CDC42* y *CDC24* eliminan la capacidad de gemar, y por tanto las células crecen de forma isodiamétrica, lo cual implica a Cdc24p y Cdc42p como responsables de la generación del eje de polaridad. También está descrita la capacidad de Cdc24p y de Cdc42p activado de interaccionar con la proteína Bem1p (Chenevert y col., 1992), la cual puede unirse con los filamentos de actina, postulándose que pudiera ser el eslabón que une los filamentos de actina a la maquinaria de instauración de la polaridad (Chenevert y col., 1992; Leeuw y col., 1995).

Con todos estos antecedentes, la hipótesis actual acerca de la instauración de la polaridad podría resumirse del siguiente modo (figura 6): Bud1p, a pesar de su localización a lo largo de toda la superficie de la zona interna de la membrana celular, sería activado únicamente en un punto concreto por la acción de la maquinaria encargada de la elección de la polaridad (Michelitch y Chant, 1996). Esta activación le permitiría interaccionar y reclutar al sitio de polaridad a Cdc24p, que es la GEF de Cdc42p, la cual, en su forma activa, interacciona con Bem1p que, a su vez, dirige hacia ese punto a los filamentos de actina. Cdc42p también interacciona con el módulo PAK, formado por Ste20p (Cvrcková y col., 1995) implicado, igualmente, en la interacción con el citoesqueleto de actina.

Para el mantenimiento del crecimiento polarizado, se ha observado la esencialidad de otras GTPasas de pequeño tamaño, conocidas como Rho1-4p, las cuales podrían ser activadas por Cdc42p (Matsui y Toh-e, 1992; Yamochi y col., 1994; Chant y Stowers, 1995).

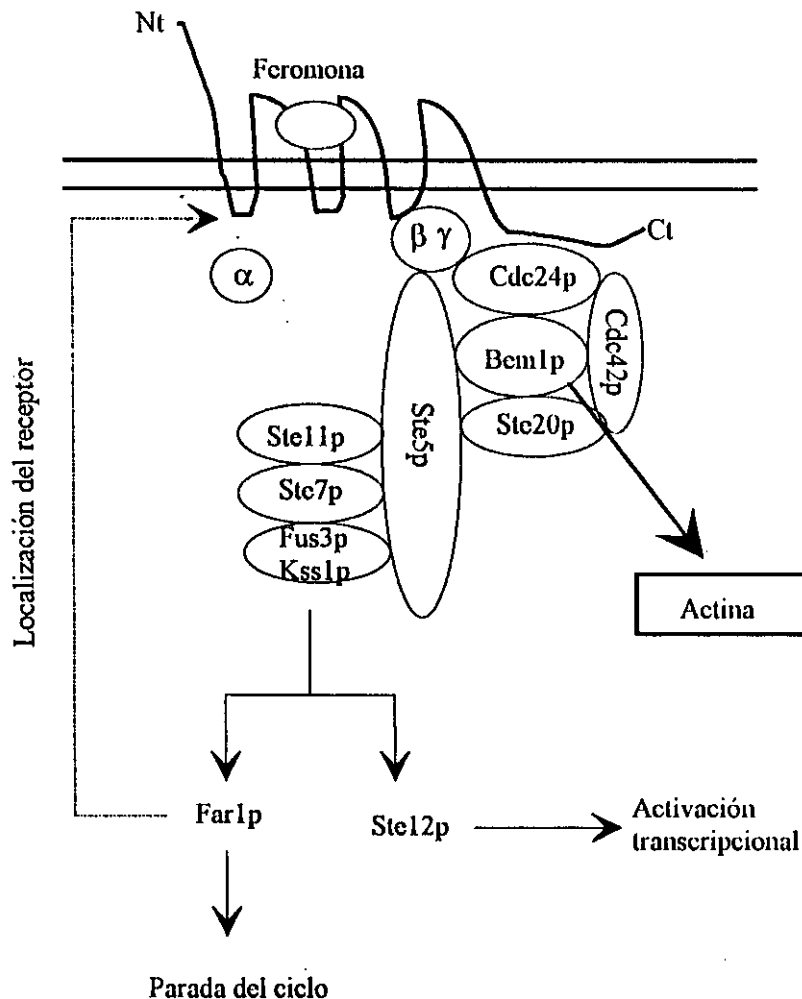
Un esquema de todo el proceso de elección del eje de polaridad, así como de su instauración, por la acción de la cascada de activación de las distintas GTPasas enumeradas anteriormente, se muestra en el figura 6.



**Figura 6:** Hipótesis actual sobre la instauración de la polaridad en *S. cerevisiae*.

Hasta ahora hemos descrito lo que se conoce sobre la maquinaria encargada del establecimiento de la polaridad en el proceso de gemación, pero existe otro momento en el ciclo vital de la levadura en el que se requiere una nueva polarización de la célula: el proceso de conjugación.

A diferencia de la gemación, en la conjugación, la señal que desencadena el proceso es externa y está vinculada a un gradiente de concentración de feromonas del tipo sexual opuesto en el medio (Dorer y col., 1995). La respuesta celular a estos estímulos ya la hemos descrito en el apartado 1.2. del presente capítulo de introducción. Sin embargo, en este momento hay que añadir al proceso de parada del ciclo celular y expresión de genes implicados en el proceso de conjugación, descrito previamente, todos los procesos morfológicos y de polaridad que determinan la aparición de la proyección conjugativa.



**Figura 7:** Determinación de la polaridad en el proceso de conjugación.



El primer problema que ha de solucionar la célula, reside en la modificación del patrón de polaridad que ocurre en el proceso de apareamiento. Es decir, las células han de obviar las señales de polaridad axial para dirigir ésta hacia el gradiente de feromonas. En este proceso parece implicada la proteína Far1p, la cual, además de estar encargada de detener el ciclo celular en la fase G1, actúa en el proceso morfogénico de la formación del *shmoo*, ya que su ausencia impide que las células orienten las proyecciones conjugativas adecuadamente (Valtz y col., 1995; Roemer y col., 1996). También se ha determinado que, cuando las células se encuentran en presencia de feromonas, la expresión de *BUD10* y de *BUD4* está muy disminuida (Roemer y col., 1996; Holme y col., 1996).

Se postula que la unión de la feromona al receptor, además de desencadenar la cascada de respuesta descrita, sirve para marcar el lugar de polaridad al que el citoesqueleto ha de reorganizarse (Roemer y col., 1996). Recientemente se ha descrito la interacción de Cdc24p con las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G heterotrimérica, responsables de la activación de la cascada de conjugación (Leberer y col., 1997; Nern y Arkowitz, 1998). Cdc24p es capaz de activar a Cdc42p y de unirse a Bem1p (Park y col., 1997), determinando la polarización del citoesqueleto de actina hacia el punto de recepción de las feromonas.

### 2.3.3. Localización del lugar de septación: las septinas.

Como ya hemos expuesto, las células de *S. cerevisiae* tienen genéticamente determinado un patrón para la elección del punto de gemación, hacia el que polarizan la maquinaria biosintética y donde crece una yema hasta que presenta un tamaño similar al de la célula madre. Lógicamente, las células también han de tener determinado dónde y cuándo construir el septo que las separe e independice. La regulación temporal parece estar desencadenada por la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p (Lew y Reed, 1993), mientras que el regulador espacial se cree que pudiera estar formado por una estructura en forma de doble anillo, de 10 nm de espesor (Byers y Goetsch, 1976), que se encuentra en la constricción o cuello que existe entre la célula madre y la célula hija. El anillo de 10 nm está formado por fibrillas, compuestas por cuatro proteínas llamadas septinas (Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p, Cdc12p) (Kim y col., 1991; Longtine y col., 1996; Chant, 1996a). Las cuatro proteínas son estructuralmente similares (Flescher y col., 1993), sin embargo, el defecto en cualquiera de ellas determina una septación deficiente (Cid, 1996) y la ausencia de citoquinesis (Hartwell, 1971a).

El anillo de septinas se ensambla en la fase G1, aproximadamente quince minutos antes de la emergencia de la yema. Su ubicación, a través de un mecanismo no definido, está relacionada con las señales de polaridad celular, ya que el anillo se ensambla en el lugar donde se va a producir la emergencia de la nueva yema. La yema naciente brota atravesando el anillo de septinas, el cual no se desensambla y permanece en dicha localización hasta la conclusión de la septación.

Se piensa que la estructura de septinas sirve como molde para el ensamblaje de diferentes proteínas encaminadas a desarrollar, entre otros procesos, funciones relacionadas con la determinación del patrón de polaridad. Se ha descrito que junto a la estructura de septinas aparecen proteínas como:

- Bud3p que se localiza en la estructura de septinas instantes antes de la septación (Chant y col., 1995).
- Bud4p también se colocaliza con las septinas, ensamblándose a la vez que Bud3p, siendo esencial la ubicación de esta última para que Bud4p se localice (Halme y col., 1996).
- Bud10p que se colocaliza con las septinas desde estadios tempranos de G1 (Sanders y Herskowitz, 1996).

La localización de la estructura de septinas, así como el estudio del fenotipo de los mutantes de las mismas, hace suponer que dicha estructura también sirve de soporte a elementos del mecanismo implicado en determinar y en ubicar temporalmente el proceso de septación; es decir, en virtud de mecanismos aún desconocidos, se cree que la estructura generada por las septinas recibe señales de la maquinaria responsable de la progresión y control del ciclo celular, destinadas a la coordinación del proceso de septación con el resto de eventos celulares (Chant, 1996a), lo que determina la polarización del citoesqueleto de actina y con él toda la maquinaria biosintética, hacia la zona donde se generará el septo.

Las septinas están implicadas, a su vez, en la biosíntesis del septo, ya que, los mutantes en las septinas sintetizan perfectamente la quitina pero no son capaces de localizarla de forma correcta en la zona del septo (Longtine y col., 1996). Se ha descrito la interacción de Cdc10p con Chs4p (integrante del complejo encargado de sintetizar la quitina del septo) a través de una proteína intermediaria llamada Bni4p, definiéndose, al menos en parte, el detalle molecular de la implicación de las septinas en la síntesis del septo (de Marini y col., 1997).

Las septinas también participan en la formación de la proyección de apareamiento, debido a que aparecen en la base del *shmoo* y a que su mutación hace disminuir la capacidad de apareamiento de las células (Kim y col., 1991; Ford y Pringle, 1991). Apoyando la implicación de las septinas en el proceso de apareamiento, se ha determinado la interacción de la septina Cdc12p con la proteína Afr1p, que se expresa sólo durante la conjugación y es esencial para la formación de la prolongación conjugativa (Konopka y col., 1995). Otro argumento más, que muestra la implicación de las septinas en el proceso de apareamiento, lo encontramos en el hecho de que los mutantes en las septinas no son capaces de localizar correctamente la quitina en la base del *shmoo* (Longtine y col., 1996).

Además de estas cuatro septinas, recientemente se han encontrado otras dos, Spr3p y Spr28p, que son específicas del proceso de esporulación, si bien en dicho proceso también se ha detectado una elevada expresión de Cdc10p (Longtine y col., 1996).

#### **2.3.4. Implicación del citoesqueleto en la morfogénesis.**

La actina mayoritaria, codificada por el gen *ACT1* (Novick y Botstein, 1985), se organiza dando lugar a dos tipos de estructuras: filamentos y "parches". Los parches son acúmulos de actina, de estructura desconocida, que se concentran en los sitios de crecimiento de la superficie celular durante los procesos de conjugación y de gemación. Se cree que los parches de actina están anclados a invaginaciones de la membrana plasmática (Mulholland y col., 1994); si bien, contradiciendo el estatismo que supone esta hipótesis, se ha descrito la

rapidez con que estos parches se mueven a lo largo de toda la levadura (Waddle y col., 1996; Doyle y Botstein, 1996), durante en desarrollo de la misma. Los filamentos de actina, formados por monómeros de Act1p, se dirigen a los parches en las zonas de crecimiento polarizado.

El citoesqueleto de actina está involucrado en la secreción polarizada de todos los componentes necesarios para el crecimiento de la superficie celular. En este ámbito se han descrito dos proteínas Myo2p y Myo4p (miosinas de clase V) como esenciales para el proceso de secreción y se piensa que están implicadas en promover el transporte de vesículas a través de los filamentos de actina, hasta el sitio de crecimiento polarizado (Govindan y col., 1995).

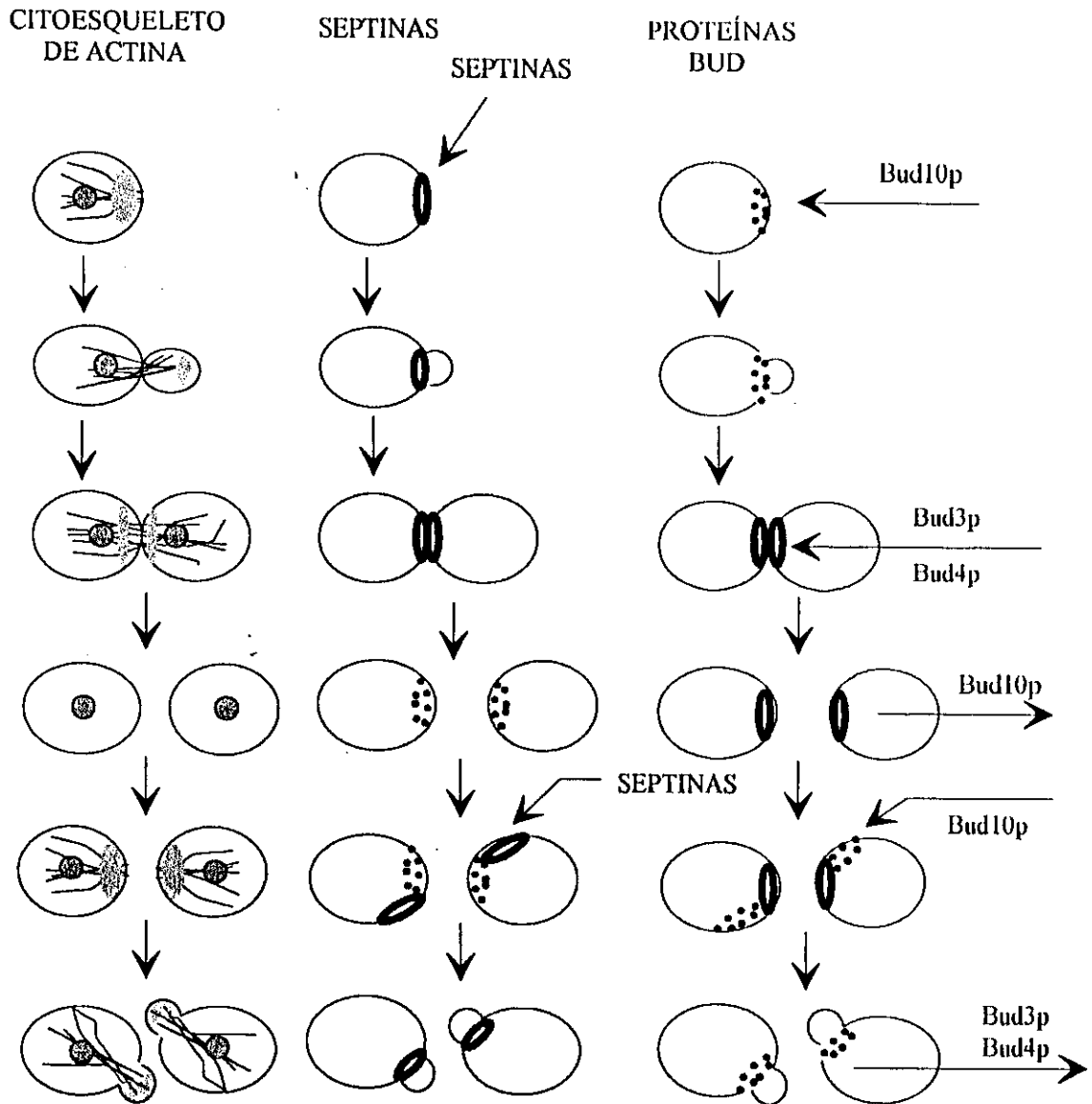
Para la secreción polarizada también es necesaria la proteína Sec4p, capaz de unir GTP y que se localiza en los sitios de crecimiento polarizado (Novick y Brennwald, 1993). Sec4p forma un complejo en la membrana con Sec8p y Sec15p, siendo responsables de la exocitosis de las vesículas secretoras (Brewster y col., 1993; Novick y Brennwald, 1993), indispensable para la salida al espacio periplásmico de los precursores de la pared celular.

Otro elemento involucrado en la secreción de la quitina de la pared celular es la tropomiosina, codificada por el gen *TPM1* (Liu y Brestcher, 1992).

En cuanto al citoesqueleto microtubular, hay resultados que lo excluyen de la secreción de vesículas (células tratadas con nocodazol, inhibidor de la formación de microtúbulos, así como mutantes en el gen de la tubulina, conjugan y geman perfectamente) (Huffaker y col., 1988; Jacobs y col., 1988). Sin embargo, no se puede olvidar que es necesaria la orientación del SPB hacia los lugares de crecimiento polarizado (Madden y col., 1992; Hyman y Stearns, 1992) lo cual sugiere que, tal vez, el citoesqueleto microtubular participe junto al citoesqueleto de actina, pero dejando el papel predominante a este último (Cid y col., 1995; Orlean, 1997).

### 2.3.5. Otros componentes esenciales para la morfogénesis de *S. cerevisiae*.

Existen gran cantidad de proteínas relacionadas con la polaridad y la morfogénesis de *S. cerevisiae*, si bien su función o los procesos en que intervienen no están totalmente esclarecidos. Merecen mención especial un grupo de proteínas que se localizan en el lugar de la yema incipiente y se mantienen polarizadas en la parte distal de la yema a lo largo de todo el proceso de desarrollo de la misma. Entre ellas, encontramos a Spa2p (Snyder y col., 1991), cuya ausencia parece no tener efecto en el crecimiento, aunque recientes estudios la involucran en el mantenimiento del patrón de gemación bipolar (Zahner y col., 1996). Spa2p, sin embargo, parece desarrollar una función importante en el proceso de conjugación, ya que se localiza en la zona apical de la proyección conjugativa y las cepas mutantes *spa2* presentan una capacidad disminuida para conjugarse (Snyder y col., 1991). También encontramos en esta ubicación a la calmodulina (Brockhoff y Davis, 1992) y a proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, tales como Myo2p (Lillie y Brown, 1994), Abp1p (*Actin Binding Protein*) (Drubin y col., 1988) y Cap2p (*Capping-Actin Protein*) (Amatruda y Cooper, 1992).



**Figura 8:** Ubicación temporal y espacial a lo largo del ciclo celular del citoesqueleto de actina y núcleos (Izquierda), septinas (Centro) y proteínas implicadas en la selección del patrón axial de polaridad (Derecha).

### 3. EL MUTANTE *lyt1* DE *S.cerevisiae*.

Los mutantes *lyt* fueron aislados en una búsqueda destinada a localizar genes cuyo defecto confiriera un fenotipo lítico termosensible a las células (Cabib y Durán, 1975). Estos autores sometieron a la cepa S288C de *Saccharomyces cerevisiae* a tratamiento con el agente mutagénico etil-metanosulfonato (EMS), crecieron las células a 25°C y posteriormente las replicaron en placas que contenían p-nitrofenilfosfato, incubándolas a 37°C. Seleccionaron aquellos clones capaces de crecer a 25°C, pero que a 37°C mostraban un fenotipo lítico, el cual se ponía de manifiesto debido a que la lisis de las células produce la liberación de la fosfatasa alcalina, enzima estrictamente intracelular, capaz de hidrolizar el p-nitrofenilfosfato produciendo p-nitrofenol, que a pH alcalino confiere coloración amarilla al medio de cultivo adyacente a la colonia de células lisadas. De este modo se aislaron diferentes mutantes, entre los que se encuentran los mutantes *lyt1* y *lyt2* estudiados en nuestro laboratorio.

Se estableció que el mutante *lyt2* porta una mutación en el gen *SLT2/MPK1* (Torres y col., 1991; Martín y col., 1993; Lee y col., 1993). La proteína Slt2p es una quinasa de la familia MAP, pieza clave, por tanto, de una ruta de transducción de señales encabezada por la también quinasa Pkc1p. Esta última puede recibir el estímulo activador tanto del ciclo celular a través del complejo Cdc28p-Cln1, 2 y 3p (Zarzov y col., 1996; Gray y col., 1997), como de un supuesto receptor de la membrana plasmática llamado Hcs77p (Gray y col., 1997). Se postula que Hcs77p es capaz de detectar los cambios físicos que sufre la membrana cuando la célula es sometida a elevadas temperaturas o a condiciones hipoosmóticas de presión (Gray y col., 1997). Así pues, esta ruta está implicada, por una parte en el mantenimiento de la integridad celular a elevadas temperaturas y por otra, en la morfogénesis de la yema en la fase G1/S del ciclo celular.

En cuanto al mutante *lyt1*, en un primer intento por clonar el gen cuyo defecto es responsable del fenotipo lítico, se obtuvo el gen *SPO12*, previamente clonado por Malavasic y Elder (1990) debido a su implicación en el ciclo meiótico. Sin embargo, estudios posteriores confirmaron que *SPO12* es un gen supresor en multicopia del fenotipo lítico del mutante *lyt1* (Molero y col., 1993). Estudios del fenotipo del mutante *lyt1* desvelaron, además de la lisis, la pérdida del patrón axial de polaridad, típico de las cepas haploides de *S. cerevisiae* (Molero y col., 1993).

En estudios posteriores, realizados en nuestro laboratorio, se demostró que el mutante *lyt1* se encuentra afectado en el gen *CDC15*; a esta conclusión se llegó gracias a ensayos de complementación llevados a cabo con una genoteca de *S. cerevisiae* construida en el vector centromérico YCp50 (Rose y col., 1987), clonándose el gen *CDC15* como responsable de la complementación de todos los defectos fenotípicos del mutante *lyt1*. Este resultado se encuentra avalado por el hecho de que una cepa diploide *cdc15-1/lyt1* muestra un carácter lítico similar al de una cepa *lyt1* (Yuste, 1995; Jiménez y col., 1998).

El mutante *cdc15* se caracteriza por la detención del ciclo celular con la yema del tamaño de la célula madre y los núcleos divididos (Culotti y Hartwell, 1971); si bien el aparato microtubular no se encuentra desensamblado, lo que indica que las células han detenido el ciclo celular en la anafase mitótica (Surana y col., 1993). La mutación *cdc15-1* ha sido, y es, muy utilizada como herramienta para realizar la sincronización de cultivos de *S. cerevisiae*, ya que,

a 37°C se consigue la detención de las células en la anafase mitótica, el retorno a temperatura permisiva devuelve la capacidad para seguir el ciclo normalmente, pero ya, de una forma sincrónica.

El gen *CDC15* es un gen esencial que codifica una proteína quinasa de 974 aminoácidos (Schweitzer y Philippsen, 1991), con una estructura que podríamos calificar de anómala, ya que, las proteínas quinasas, de modo general, presentan el dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal, mientras que Cdc15p dispone los once dominios característicos de las proteínas quinasas en el extremo amino terminal.

El homólogo en *Schizosaccharomyces pombe* es el producto del gen *cdc7<sup>+</sup>*, que muestra una elevada similitud en el dominio quinasa, pero no en el resto de la secuencia (Fankhauser y Simanis, 1994). El producto del gen *cdc7<sup>+</sup>* es esencial para el proceso de septación en la levadura de fisión. Su sobreexpresión determina la aparición de numerosas rondas de septación sin división nuclear y es capaz de complementar en un plásmido multicopia, aunque muy pobremente, a un mutante *cdc15-1* de *S. cerevisiae* (Fankhauser y Simanis, 1994). También se ha intentado clonar, sin éxito hasta el momento, el homólogo en la levadura *Candida albicans*, ya que nos encontramos ante un gen esencial que podría, por tanto, tener utilidad como diana para el diseño de antifúngicos (San José, comunicación personal).

La función de la proteína Cdc15p permanece sin determinar, aunque hay estudios que la implican, directa o indirectamente, en la desorganización del huso mitótico y separación de la membrana celular (Copeland y Snyder, 1993), basándose en que mutantes *cdc15*, incubados a temperatura restrictiva, detienen el ciclo nuclear con el huso mitótico ensamblado y las membranas nucleares sin dividir. Estudios posteriores relacionan a Cdc15p con la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, responsable de la salida de la anafase mitótica, ya que los mutantes *cdc15-1* detienen el ciclo celular en la anafase, presentando una elevada actividad de la quinasa Cdc28p-Clb2p (Surana y col., 1993). Estos mismos autores, hipotetizan sobre la posibilidad de que la parada del ciclo celular no sea debida al papel de Cdc15p en la desactivación del complejo director del ciclo celular, sino que sea la expresión de un mecanismo de control del ciclo celular (*checkpoint*), que detectaría las anomalías conferidas por la mutación del gen *CDC15* y detendría el ciclo. Esta posibilidad es también compartida por Murray (1995), autor que defiende la hipótesis de la existencia de numerosos *checkpoints* enmascarados bajo la apariencia de paradas de ciclo en los mutantes *cdc*.

En el laboratorio del Dr. Toh-e se clonó el gen *TEM1* (Shirayama y col., 1994b), como supresor en multicopia de la sensibilidad a bajas temperaturas de un mutante en el gen *LTE1*, gen esencial para la terminación de la fase M (Shirayama y col., 1994a). Los mutantes condicionales en el gen *TEM1* detienen el ciclo celular al final de la mitosis y son suprimidos por una elevada dosis del gen *CDC15*. Además, la proteína Cdc15p activada constitutivamente por el cambio del residuo de alanina 163 por una isoleucina, es capaz de suprimir, en monocopia, el defecto de una cepa *tem1*, pero no el de una cepa delecionada en el gen *TEM1* (Shirayama y col., 1994b). Tem1p es una proteína capaz de unir GTP y, según estos autores, *CDC15* presenta similitud significativa con diferentes MAPKKK tales como Ste11p, byr2 (*S. pombe*) y Bck1p; la conjunción de los datos anteriores llevó a estos autores a hipotetizar sobre la existencia de una nueva ruta de transducción de señales, encabezada por Tem1p, y en la que estarían implicadas otras proteínas precisas para la consecución de la salida de la mitosis como Dbf2p, Dbf20p, Cdc5p, Cdc14p, Spo12p y Cdc15p.

Otra interesante aproximación hacia la clarificación de la función de Cdc15p, fue llevada a cabo en el laboratorio de la Dra. Castañón, donde se clonó, como supresor en multicopia del defecto de una cepa *cdc15*, un gen de *Xenopus* que codifica una proteína de la familia Ras (Spevak y col., 1993). Ras1p y Ras2p de *S. cerevisiae*, al contrario que sus homólogos en mamíferos, activan la adenilato ciclasa, enzima encargada de producir cAMP a partir de ATP (Beckner y col., 1985). El grupo de la Dra. Castañón encontró que, para suprimir el defecto de la mutación *cdc15*, es suficiente con reducir los niveles de cAMP de la célula, ya que tanto la sobreexpresión del gen *PDE2* -gen que codifica una fosfodiesterasa encargada de hidrolizar el cAMP-, como el doble mutante *cdc15 ras2* que presenta disminuidos los niveles de cAMP, no manifiestan el fenotipo de parada en mitosis característico de los mutantes *cdc15*. Además, encontraron que un mutante *cdc15* detiene su ciclo celular con niveles incrementados de cAMP y observaron una ligera disminución de la cantidad de cAMP, al final de la mitosis, dependiente de la actividad de Cdc15p. Todos estos resultados hacen pensar que Cdc15p se halla relacionado, de alguna manera todavía sin determinar, con la dinámica del cAMP en la célula. Estos mismos autores explican la supresión por parte del gen de *Xenopus*, en virtud de la unión no cooperativa, del producto de éste con la adenilato ciclasa de la levadura, impidiendo su normal activación por Ras1p y Ras2p.

En esta misma línea apareció otro trabajo en el que se involucra a Ras1p, Ras2p y Bud1p en la terminación de la mitosis, pero de forma independiente del cAMP (Morishita y col., 1995). Estos autores llegaron a esta conclusión estudiando el comportamiento del cuádruple mutante *ras1 ras2 bud1 cyr1* (el gen *CYR1* codifica la adenilato ciclasa). Añadiendo cAMP exógeno (con lo que eliminan la influencia de la ruta de cAMP mediada por Ras), encontraron que, a elevada temperatura, detenían el ciclo celular al final de la mitosis con los núcleos separados. Este defecto lo suprimieron con la sobreexpresión de los genes *CDC15* y *CDC5*. Este trabajo parece contradecir la influencia del cAMP en la terminación de la mitosis descrita por la Dra. Castañón; sin embargo, se encuentra en sintonía con la hipótesis de la existencia de una ruta de transducción de señales propuesta por el grupo del Dr. Toh-e.

El grupo de la Dra. Castañón, en su búsqueda de supresores del defecto del gen *CDC15* con la genoteca de *Xenopus*, también clonó un gen que codifica una proteína que posee motivos  $\beta$ -transducina (Spevak y col., 1993) y que es similar a Cdc20p, otro supresor del fenotipo *cdc15* (Amon y col., 1992), relacionado con la dinámica microtubular en la metafase y posiblemente con la regulación de la progresión del ciclo a través de la mitosis (Schwab y col., 1997).

Además la mutación *cdc15* es suprimida por:

- La expresión en multicopia del gen *SPO12* (Molero y col., 1993). El producto del gen *SPO12* está descrito que actúa como regulador de la actividad de las quinasas Dbf2p y Dbf20p (Toyn y Johnston, 1993), necesarias para la salida de la anafase (Toyn y Johnston, 1994).

- La sobreexpresión del gen *SIC1* (Toyn y col., 1996), que codifica un inhibidor del complejo Cdc28p-Clb2p, el cual además es sintético letal con el gen *DBF2* (Toyn y col., 1996). Estos autores sugieren la posibilidad de que existan dos mecanismos paralelos para la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, uno

integrado por el inhibidor Sic1p y el otro por la supuesta ruta de quinasas: Dbf2p, Dbf20p, Cdc15p, Cdc5p, Tem1p, Ltelp y la proteína reguladora Spo12p. Del mismo modo, opinan que la contribución más importante a la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p es la aportada por las quinasas, ya que su defecto detiene el ciclo en ese punto, mientras que la función de Sic1p no es esencial para la célula.

- Múltiples copias de *CDC5* (Kitada y col., 1993). Cdc5p es una quinasa que también suprime a los mutantes *cdc20* y *dbf2*.

- Una sola copia del gen *CDC14*, que codifica una proteína fosfatasa, si bien, la actividad fosfatásica no es precisa para la supresión (Shirayama y col., 1996).

- Elevado número de copias del gen de *Candida albicans* *CLT1* (San José, comunicación personal). Este gen codifica una proteína capaz de unir GTP, que también es capaz de suprimir a la mutación *tem1-3*. Estos autores sugieren que podría tratarse del homólogo funcional en *C. albicans* del gen *TEM1* de *S. cerevisiae*.

Por su parte el gen *CDC15* es capaz de suprimir:

- Al mutante *tem1-3*, cuando se encuentra en elevado número de copias (Shirayama y col., 1994b).

- Al mutante *cdc5-1*, cuando se encuentra en elevado número de copias (Kitada y col., 1993).

Como puede observarse, el sistema de interacciones entre las proteínas implicadas en la salida de la anafase mitótica es muy complicado y el esclarecimiento de la función de cada una de ellas, así como el mecanismo general que integran, parece mantenerse, aún, alejado de nuestra comprensión.



## OBJETIVOS.

- 1. Rescate alélico y secuenciación de la mutación *lyt1* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2. Caracterización y estudio fenotípico de los mutantes en el gen *CDC15* de *S. cerevisiae* y
  - en especial de los que portan el alelo mutante *cdc15-lyt1*.
- 3. Estudio del mecanismo molecular en que se encuentra involucrado el producto del gen *CDC15*. Estudio de la relación de Cdc15p con otras proteínas implicadas en el final de la mitosis.



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. CEPAS UTILIZADAS.

#### 1.1. CEPAS DE LEVADURA.

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo, así como sus características genotípicas más relevantes, se muestran en la tabla 2.

#### 1.2. CEPAS DE *Escherichia coli*.

La cepa de *E. coli* utilizada en las técnicas de biología molecular fue DH5 $\alpha$  [K-12 $\Delta$ (*lacZYA-argF*)<sub>u169</sub> *supE44 thi-1 recA1 endA1 hsd17 gyrA relA1* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15)].

#### 1.3. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.

Las cepas de *E. coli*, portadoras de los diferentes plásmidos, se almacenaron a -20°C en una solución de glicerol al 50% (v/v).

Las cepas de *S. cerevisiae* se almacenaron a -70°C en una solución de glicerol al 15% (v/v).

### 2. PLÁSMIDOS Y GENOTECAS.

#### 2.1. PLÁSMIDOS.

Las características de los plásmidos empleados en este trabajo figuran en la tabla 3.

#### 2.2. GENOTECAS.

Las genotecas empleadas para los ensayos de dos híbridos y la clonación del homólogo del gen *CDC14* de *C. albicans* se detallan en la tabla 4.

Tabla 2: Cepas de *S. cerevisiae*.

Nombre	Genotipo	Origen
1783	<i>MATa, ura3-52, leu2-3,112, trp1-1, his4, can<sup>r</sup></i> .	Dr. D. Levin, (Univ. John Hopkins, USA).
1784	<i>MATα, ura3-52, leu2-3,112, trp1-1, his4, can<sup>r</sup></i> .	Dr. D. Levin, (Univ. John Hopkins, USA).
TD28	<i>MATa, ura3-52, inol-131, can<sup>r</sup></i> .	Dr. H. Martín, (Este departamento).
YPH499	<i>MATa, Leu2, ade2, ura3, his3, trp3, lys2</i> .	Dr. M. Gustin, (Univ. Rice, USA).
L2C24d	<i>MATα, cdc15-lyt1, ura3-52</i> .	Dr. G. Molero, (Este departamento).
4dA	<i>MATa, cdc15-lyt1, leu2, his3</i> .	Dr. G. Molero, (Este departamento).
DU3	<i>MATa/α, cdc15-lyt1/cdc15-lyt1, ura3-52/ura3-52</i> .	Dr. G. Molero, (Este departamento).
RH210	<i>MATa, cdc15-1, ade2-1, his4, leu2-3,112, trp1-1, ura1</i> .	Dr. Kuhre, (Biozentrum, Suiza).
MY1	<i>MATa/α, cdc15-1/cdc15-lyt1, ura3-52/ura1</i> .	Dr. M. Yuste, (Este departamento).
L119-7d	<i>MATα, dbf2, ura3-52, trp1-1,2, ade1</i> .	Dr. Johnston, (National Institute for Medical Research, UK).
EO156	<i>MATa, tem1-3, ura3-52, leu2-3,112, his3, trp1-1</i> .	Dr. A. Toh-e, (Univ. Tokyo, Japón).
RAY-3a	<i>Isogénica silvestre de EO156</i> .	Dr. A. Toh-e, (Univ. Tokyo, Japón).
VCY1	<i>MATa, cdc10-11, ura3-52, leu2-3,112, trp1-1, his4, can<sup>r</sup></i> .	Dr. V.J. Cid, (Este departamento).
Y882	<i>MATα, cdc10::URA3, ura3-52, lys2-801, ade2-101, his3Δ200, trp1Δ</i> .	Dr. M. Snyder, (Univ. Yale, USA).
VCY242d	<i>cdc10-11, cdc15-1, ura3-52, leu2-3,112</i> .	Dr. V.J. Cid, (Este departamento).
JC223	<i>MATα, bud1::URA3, leu2-3,112, ura3-52</i> .	Dr. J. Chant, (Univ. Harvard, USA).
JJY1	<i>bud1::URA3, cdc15-1</i> .	Este trabajo.
DR1	<i>MATa/α, cdc15-1/cdc15-1, ade2/ade2</i> .	Este trabajo.
RH1779	<i>MATa, cdc14, ade2, his4, leu2</i> .	Dr. Kuhre, (Biozentrum, Suiza).
HF7c	<i>MATa, ura3-52, his3, lys2, ade2, trp1, leu2, gal4, gal80, LYS2::GAL1-HIS3, URA3:::(GAL4 17-mers)<sub>3</sub>-CYC1-LacZ</i> .	Clontech.
CDCU	<i>cdc14, ura3-52</i> .	Este trabajo.

Tabla 3: Plásmidos empleados en este trabajo.

Nombre	Características	Origen
Bluescript KS y SK	<i>ori, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Stratagene.
YIp5	<i>ori, URA3, amp<sup>r</sup>.</i>	Struhl y col., 1979.
YCp50	<i>ori, ARS1, CEN4, URA3, amp<sup>r</sup>.</i>	Jonhston y Davis, 1984.
pHR70	<i>ori, ARS1, CEN4, URA3, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	M. Mazón, (I.I.B., Madrid).
pBS9	<i>ori, ARS1, CEN4, URA3, CDC15, amp<sup>r</sup>.</i>	Schweitzer y Philipssen, 1991.
pYEURA3	<i>ori, ARS1, URA3, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Clontech.
YEpLac181	<i>ori, ARS1, 2μ, LEU2, amp<sup>r</sup>.</i>	Gietz y Sugino, 1988.
YEp352	<i>ori, ARS1, URA3, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Hill y col., 1986.
pGBT9	<i>ori, 2μ, TRP1, GAL4(1-147), amp<sup>r</sup>.</i>	Clontech.
pIR2	<i>ori, ARS1,2, CaURA3, CaEXG1</i>	I. Ríos, (Este departamento).
pGAD.R	<i>ori, 2μ, LEU2, GAL4 (768-881), amp<sup>r</sup>.</i>	Clontech.
YCp111CDC10	<i>ori, ARS1, CEN1, LEU2, CDC10, amp<sup>r</sup>.</i>	Dr. V.J. Cid (Este departamento).
pJWc100	<i>ori, ARS1, URA3, CDC14, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Dr. A. Carmen, (Univ. California, USA).
pLA10	<i>ori, ARS4, URA3, CDC10-GFP, amp<sup>r</sup>.</i>	L. Adamíková, (Este departamento).
p6a12	<i>ori, ARS1, URA3, PDE2 lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Dr. M. Castañón, (Boehringer Institute, Austria).
pT7Blue T	<i>ori, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Novagen.
YCA48B	<i>ori, ARS1, LEU2, CDC14, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Este trabajo.
pJJ1	<i>ori, ARS1, URA3, CDC15, lacZ, amp<sup>r</sup>.</i>	Este trabajo.

Tabla 4: Genotecas empleadas.

Genoteca	Vector	Origen
Genómica de <i>C. albicans</i> .	pYEURA3	Dr. J. Plá, (Este departamento)
De promotores de <i>C. albicans</i> .	pIR2	I. Ríos, (Este departamento).
Genómica de <i>S. cerevisiae</i> unida al dominio de activación del gen <i>GAL4</i>	pGAD.R	Clontech.

### 3. MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.1. MEDIOS DE CULTIVO GENERALES.

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en la tabla 5. Los diferentes medios se han usado en estado líquido o sólido mediante la adición de agar-agar (Difco) a una concentración del 2% (p/v). La esterilización se realizó mediante autoclavado (Selecta 437P y presoclave 75) bajo las siguientes condiciones: 121°C de temperatura, 2.1 atmósferas de presión y durante 20 minutos.

Tabla 5: Medios de cultivo generales.

Medio de cultivo	Utilidad	Composición
<b>LB</b>	Crecimiento de <i>E. coli</i>	10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl.
<b>YEPD</b>	Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	20 g/l glucosa, 10 g/l extracto de levadura, 20 g/l peptona.
<b>YED</b>	Crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	20 g/l glucosa, 10 g/l extracto de levadura.
<b>MPE</b>	Medio de Preesporulación de <i>S. cerevisiae</i>	10 g/l extracto de levadura, 30 g/l extracto de carne, 50 g/l glucosa.
<b>ME</b>	Medio de Esporulación de <i>S. cerevisiae</i>	10 g/l Acetato potásico, 1 g/l extracto de levadura, 0.25 g/l glucosa.

Los diferentes componentes, enumerados anteriormente, fueron suministrados por Pronadisa.

La composición del medio mínimo para el crecimiento selectivo de las distintas cepas de *S. cerevisiae* fue: 20 g/l de glucosa, 5 g/l de Acetato amónico y 1.6 g/l de YNB (*Yeast Nitrogen Base*) de Difco. Al medio mínimo así confeccionado se le añadieron los diferentes aminoácidos y bases nitrogenadas requeridas a una concentración de 20 mg/l, exceptuando la leucina que se suplementó a 30 mg/l, todos ellos fueron suministrados por Merck.

#### 3.2. MEDIOS DE CULTIVO ESPECIALES PARA *E. coli*.

La selección y el crecimiento de clones transformantes de *E. coli* se realizó siempre por su capacidad de crecimiento en medio LB suplementado con ampicilina (Britapen, SKB) disuelta en agua, a una concentración final de 100 µg/ml y añadida posteriormente al autoclavado del medio.

La selección blanco-azul conferida por la presencia del gen *lacZ* en los diferentes plásmidos se llevó a cabo en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, al que fue añadida una concentración de 80 µg/ml de X-gal, sustrato cromogénico de la β-galactosidasa (suministrado por Boehringer-Mannheim), disuelto en N,N-dimetilformanida (Merck) y 50 µg/ml de IPTG

(Boehringer-Mannheim); ambos esterilizados por filtración (filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, suministrados por Millipore) y adicionados posteriormente al autoclavado del medio.

### 3.3. MEDIOS ESPECIALES PARA *S. cerevisiae*.

La selección de clones líticos se realizó colorimétricamente, añadiéndose a los medios sólidos apropiados, después del autoclavado, una concentración 40  $\mu\text{g/ml}$  de BCIP (Boehringer-Mannheim), sustrato de la fosfatasa alcalina, enzima estrictamente intracelular, que al lisarse las células se pone en contacto con el BCIP, hidrolizándolo y tinteando de color azul verdoso el medio de cultivo circundante a la colonia.

La selección de clones que han perdido el marcador *URA3* se realizó por crecimiento en placas de medio mínimo suplementadas con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas y una concentración 0.7  $\mu\text{g/ml}$  de ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA) (Sigma). El 5-FOA es utilizado por las células que disponen de la ruta de síntesis de uracilo intacta, produciendo un intermedio tóxico que impide crecer a las células; así pues, en este medio únicamente son capaces de crecer aquellas células auxótroficas para el uracilo.

## 4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR Y MICROSCOPIA.

### 4.1. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONTRASTE DE FASES.

Los microscopios que se utilizaron fueron: un microscopio directo Nikon Optiphot, acoplado a una lámpara halógena de luz ultravioleta y un microscopio invertido Nikon Diaphot, acoplado a una lámpara ultravioleta de mercurio. El registro fotográfico se realizó con una cámara Nikon FX 35-A, la película empleada fue Ilford HP5, con una sensibilidad de 400ASA.

#### 4.1.1. Lisis celular.

La lisis celular se puso de manifiesto y se cuantificó mediante la resuspensión de las células a valorar en una solución de yoduro de propidio (Sigma) en tampón PBS, a una concentración 0.005% (p/v). Este compuesto, que sólo entra en las células cuando éstas han perdido la permeabilidad selectiva, se une a los ácidos nucleicos de doble cadena y al ser irradiado con luz ultravioleta emite luz roja.

#### 4.1.2. Tinción de quitina.

La tinción de este compuesto de la pared celular se llevó a cabo gracias a la capacidad que presenta el blanco de calcoflúor (Sigma) de unirse a la quitina y emitir luz azulada cuando es excitado con luz ultravioleta. Se recogieron las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución 10  $\mu\text{g/ml}$  de calcoflúor en tampón PBS.

#### 4.1.3. Tinción de actina.

Las células se crecieron en un baño con agitación (200 rpm), a 24°C durante 16 horas, en un matraz con 50 ml de YPD, se elevó la temperatura de incubación a 37°C y se mantuvo durante 6 horas. Se procedió a la fijación de las células mediante la adición al medio de cultivo de una solución de p-formaldehído al 8% (p/v), hasta una concentración total de fijador del 4%. Tras una hora a temperatura ambiente, se recogieron las células y se lavaron tres veces con PBS, seguidamente se resuspendieron en 200 µl de PBS, al que se añadió fluoresceína conjugada con faloidina (Sigma), hasta una concentración 0.5 µM, desde una solución madre 3.3 mM en metanol. Se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad, durante una hora, tras lo que se lavaron las células cinco veces con PBS y se resuspendieron en una solución de montaje compuesta por 70% glicerol (v/v) en PBS y 2-4% n-propilgalato (Sigma), destinada a reducir el autoapagamiento o *bleaching* que sufre la fluorescencia de la fluoresceína.

#### 4.1.4. Tinción de núcleos.

Se crecieron las células en un baño con agitación (200 rpm) a 24°C durante 16 horas, en un matraz con 50 ml de YPD, se elevó la temperatura de incubación a 37°C y se mantuvo durante 6 horas. Se recogieron 10 ml de células y se fijaron resuspendiéndolas en 1 ml de una solución de etanol al 70% (v/v) e incubándolas durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron las células con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 100 µl de PBS y se añadieron 200 µl de una solución de RNasa A 10 mg/ml, se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación, se recogieron las células, se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio 0.005% (p/v) en PBS y se montaron en un portaobjetos para su observación en el microscopio de fluorescencia.

### 4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Por un filtro Millipore de 13 mm de diámetro y 0.2 µm de tamaño de poro, previamente lavado, primero con 2 ml de metanol y después con 1 ml de cacodilato sódico 0.2 M (Sigma), se pasó 1 ml de la muestra y se introdujo el filtro en una funda cilíndrica de papel de filtro, sumergiéndola en una solución de cacodilato sódico 0.2 M durante una hora. Después se procedió a la deshidratación de la muestra, mediante la inmersión sucesiva y durante diez minutos, en soluciones de etanol al 25, 50, 70, 90 y 100%. Inmediatamente se pasó a acetona, donde se mantuvo hasta el momento de desecarlo en un desecador de punto crítico. La observación se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía de Electrónica de la Universidad de Salamanca.



### 4.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Las células se prefijaron por incubación durante 24 horas a 4°C con p-formaldehído al 2% (p/v) y glutaraldehído al 1.5% (v/v), ambos en una solución de cacodilato sódico 0.005 M y pH: 7.2. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con permanganato potásico 1% (p/v) durante 90 minutos a 4°C, tras lo que se lavaron varias veces con agua. Las muestras se deshidrataron por inmersión durante 15 minutos en sucesivas soluciones de acetona al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% en agua. La inclusión en la resina se realizó siguiendo el protocolo recomendado en el *Embed-812 Embedding kit* (Electron Microscopy Sciences). El corte de las muestras se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid, y la observación en el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca.

### 4.4. MICROSCOPIA CONFOCAL.

Las muestras y tinciones se prepararon del mismo modo que para la microscopía de fluorescencia y la observación se llevó a cabo en el Servicio de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal de la Universidad Complutense de Madrid, en un microscopio Olympus IMT-2 acoplado a un sistema confocal MRC1000 de Biorad.

## 5. TÉCNICAS DE GENÉTICA CLÁSICA.

### 5.1. CRUCES Y OBTENCIÓN DE DIPLOIDES.

Las cepas haploides de tipo sexual opuesto se crecieron en medio rico sólido YPD durante 16 horas, se juntaron ambas cepas en medio sólido YPD y se incubaron a 24°C durante 5 horas. La selección de los cigotos generados se hizo mediante selección auxotrófica o aislamiento en un microscopio Wild Heerbrugg que dispone de un micromanipulador Leitz.

### 5.2. SEGREGACIÓN MEIÓTICA.

La esporulación de las cepas diploides se realizó creciendo las células durante 16 horas a 24°C en medio rico MPE, tras lo cual se les indujo la entrada en el ciclo meiótico por incubación en medio ME sólido, pobre en fuente de carbono y nitrógeno a 24°C durante 5-10 días. Una vez esporulado el cultivo, se resuspendieron las células en agua, se añadieron 4 µl de glusulasa (Dupont), complejo hidrolítico destinado a romper la pared de las ascas y facilitar la liberación de las ascosporas. Las células se incubaron con la glusulasa durante 20 minutos, a temperatura ambiente, y se micromanipuló como se explica en el apartado anterior.

## 6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las técnicas básicas de biología molecular se realizaron siguiendo los protocolos recogidos en los manuales de biología molecular de Sambrook y de Ausubel (Sambrook y col., 1989; Ausubel y col., 1993).

Las enzimas de restricción, la T4 DNA ligasa, la fosfatasa alcalina, la Taq polimerasa y la RNasa A, así como todos los tampones y nucleótidos fueron de Boehringer-Mannheim.

La purificación de fragmentos de DNA, a partir de geles de agarosa, se realizó utilizando el "kit" comercial Sephaglass Bandprep Kit de Pharmacia.

La transformación de *E. coli* y la preparación de células competentes se realizó por el método de Hanahan (1983) o bien por electroporación en un electroporador BTX600, las condiciones usadas fueron 2.50 kV y 129  $\Omega$ .

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler. Los diferentes oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enumeran a continuación:

- Oligonucleótidos usados en el rescate del alelo *cdc15-lyt1* (tabla 6).
- Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen *CDC14* de *C. albicans* (tabla 7 y 9).
- Oligonucleótidos utilizados para construir la fusión del extremo 3' del gen *CDC15* con el dominio de unión al DNA del gen *GAL4* para el rastreo de Dos Híbridos (tabla 8).

**Tabla 6:** Oligonucleótidos rescate del alelo *cdc15-lyt1*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
1A	GTACTTCACCAAGCTTT
1B	GGGAAGCTTAAGACTGTGCCACTGC
2A	GGAGGCTCGAGGAAGGA
2B	CAGCGATGTTCTCGAGGG
3A	GGGAAGCTTTTCAGTGTTTGCT
3B	GGGAAGCTTGTACTGTAAGGTAAC

**Tabla 7:** Oligonucleótidos secuenciación *CDC14 C. albicans*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
CDC14CT	GTATCGCGTACATGAGAATGATC
CDC14NT	ATATAAATGCCCAATGTTCAAAG
CDC14NTC	ATTCAAATCTTACCCGATTCAGC

**Tabla 8:** Oligonucleótidos para la fusión en los ensayos de *dos híbridos*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
<b>2HA</b>	CCCGGGTCTAGAGGTCGACAAGTCCA
<b>2HB2</b>	CCCGGGTCTAGAGTCGACAAGACTGTGCC ACTG

**Tabla 9:** Oligonucleótidos para clonar el fragmento 3' de *CaCDC14*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'
<b>ARS3</b>	CGGAATTCATTTATGGCTTTCCCACT
<b>XOG1</b>	CGGAATTCAACCACCCAAATTGACA

La síntesis de los oligonucleótidos, así como la secuenciación automática del DNA, fue realizada por el Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad Complutense de Madrid. La purificación del DNA para su secuenciación se llevó a cabo mediante el “*kit*” comercializado por Qiagen.

### 6.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN COLONIAS DE LEVADURA.

Se crecieron las células a valorar en medio sólido durante 2 días, se replicaron a un papel *Watman* n°3, permeabilizándose por inmersión durante 10 segundos en nitrógeno líquido. Paralelamente, en una placa petri vacía, se dispuso un disco de papel de filtro con la forma y dimensiones de la misma y se impregnó con 1.8 ml de la siguiente solución:

- 33.4  $\mu$ l de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido (X-Gal), suministrado por Sigma y a una concentración 20 mg/ml disuelto en N,N-dimetilformamida.
- 5.4  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Y el resto, hasta 1.8 ml, de tampón Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16.1 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5.5 g/l, KCl 0.75 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.246 g/l. Ajustado a pH: 7.0).

El filtro de papel *Watman* se colocó con las células permeabilizadas sobre el disco de papel de filtro impregnado con la solución de X-Gal y se incubó a 28°C durante 1-24 horas.

### 6.2. ANÁLISIS RÁPIDO DE COLONIAS DE *E.coli* “MINILISIS”.

En cada eppendorf se repartieron 40  $\mu$ l de solución de lisis compuesta por: 5% (v/v) de mezcla madre de lisis [(Tris/ClH 10 mM pH:8.0, EDTA 10 mM pH:8.0, NaOH 100 mM, SDS 1% (p/v)], 10% (v/v) NaOH 1 N y 10% (v/v) SDS 10% (p/v) en agua. Se recogieron con palillos las colonias de *E. coli* y se resuspendieron en los eppendorf con la solución de lisis, se

dejaron 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 3  $\mu$ l de HCl 1 M y 5  $\mu$ l de tampón de carga de electroforesis, (cuando la mezcla no quedó de un color azulado se añadió mezcla de lisis hasta que tomó dicha coloración), se incubó 20 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó 5 minutos a elevada velocidad y se analizó todo el lisado en un gel de agarosa como describe (Sambrook y col., 1989).

### 6.3. MÉTODO RÁPIDO DE TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS.

Las células a transformar se crecieron hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.5-1, se recogieron 10 ml eliminándose completamente el medio. Se resuspendieron las células en 0.1 ml de una solución de acetato de litio 0.2 M en polietilenglicol ( $M_w$  4000) al 40% (p/v) que se preparó en el momento a partir de las soluciones madre de acetato de litio 1 M y polietilenglicol 50% (p/v), ambas en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH: 7.0). Para mejorar la eficiencia de la transformación es conveniente añadir  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final del 0.1% (v/v). A esta mezcla se le añadió el DNA que se deseaba transformar y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se añadieron 5  $\mu$ l de DNA *carrier* (10 mg/ml), procedente de esperma de salmón o timo de ternera (Boehringer Mannheim), previamente hervido durante 15 minutos. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se introdujo durante 30 minutos a  $45^{\circ}\text{C}$ , agitándose fuertemente cada 5 minutos. Por último, la mezcla se extendió directamente sobre placas con medio de cultivo apropiado para la selección.

### 6.4. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE LEVADURAS.

Se crecieron las células en matraces con YPD líquido hasta fase estacionaria, se recogieron 10 ml de células, eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo las células en el medio de cultivo remanente. Se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de lisis (Tritón X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH: 8.0, EDTA 1 mM), 200  $\mu$ l de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 50-48-2 (v/v) y 0.3 g de bolitas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (B. Braum Biotech SA). Se agitó con vortex durante 5 minutos para romper las células por cizallamiento, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad, se recogió la fase acuosa, se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico y se centrifugó de nuevo eligiéndose la fase acuosa que se precipitó añadiéndose dos volúmenes de etanol absoluto y un 10% (v/v) de una solución de acetato sódico 3 M. Se centrifugó durante 2 minutos a máxima velocidad y el precipitado se resuspendió en 0.4 ml de agua al que se añadieron 30  $\mu$ g de RNasa A, se incubó 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y se precipitó el DNA añadiéndose dos volúmenes de etanol absoluto y 10% (v/v) de una solución de acetato sódico 3 M. Se centrifugó durante 2 minutos y el precipitado, después de secarlo al ambiente, se disolvió en 50  $\mu$ l de agua.

### 6.5. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE LEVADURAS.

Se crecieron las células, hasta fase estacionaria, en matraces con medio mínimo líquido suplementado con todos los aminoácidos, excepto el del marcador del plásmido, se recogieron 10 ml de células, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el medio de

cultivo remanente. Se añadieron 200  $\mu$ L de tampón de lisis (Tritón X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH: 8.0, EDTA 1 mM), 200  $\mu$ L de la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico en proporción 50-48-2 (v/v) y 0.3 g de bolitas de vidrio de 0.45  $\mu$ m de diámetro (B. Braum Biotech SA). Se agitó con vortex durante 5 minutos para romper las células por cizallamiento, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad y se recogió la fase acuosa. De la fase acuosa se tomaron 4  $\mu$ L que se transformaron por el método de Hanahan (1983) en *E. coli* para amplificarlo.

## **7. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE DNA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Se crecieron las células en un baño con agitación (200 rpm), a 24°C durante 16 horas, en un matraz con 50 ml de YPD, se elevó la temperatura de incubación a 37°C y se mantuvo durante 6 horas. Se recogieron 10 ml de células y se fijaron resuspendiéndolas en 1 ml de una solución de etanol al 70% (v/v) donde se incubaron durante 5 minutos a 4°C. Se lavaron las células con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS y se añadieron 200  $\mu$ L de una solución de RNasa A 10 mg/ml, se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación, se recogieron las células y se resuspendieron en 0.5 ml de una solución de yoduro de propidio 0.005% (p/v) en PBS. El análisis del contenido de DNA de las células, por fluorescencia del yoduro de propidio, se realizó en un FACSCAN (Becton-Dickinson) en el Centro de Citometría de Flujo y Confocal de la Universidad Complutense de Madrid.

## **8. ENSAYOS DE SEGUIMIENTO DEL CICLO CELULAR (ENSAYOS DE *TIMING*).**

Para los ensayos de seguimiento del ciclo celular se creció la cepa a estudiar, y su cepa control, a 24°C durante 16 horas, en placas con el medio de cultivo apropiado en cada caso, pero siempre idéntico para cada cepa y su cepa control. Se tomó con un asa de siembra parte de las células y se resuspendieron en 200  $\mu$ L de YPD, se dispusieron 2  $\mu$ L de esta suspensión de células en el portaobjetos sobre una laminilla de medio YPD sólido de 1 mm de espesor (construida añadiendo, a YPD líquido, agarosa ultrapura a una concentración del 2% (p/v), se fundió al mechero y se permitió solidificar en el molde adecuado). Se permitió, durante 5 minutos, que la suspensión de células fuera absorbida por la laminilla de medio de cultivo, se colocó el cubreobjetos y se sellaron los bordes con aceite de parafina para evitar la desecación del medio de cultivo. La estructura así construida, se colocó en un microscopio de contraste de fases que dispone de una pletina termostatzada (Linkam CO102), que posibilita mantener las células a la temperatura deseada y observar el crecimiento de las mismas.

## **9. HOMOLOGÍAS Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS.**

Todas las homologías y comparación de secuencias de DNA llevadas a cabo en este trabajo se realizaron a través de *Internet*, en los bancos de datos de la EMBL empleando el programa de búsqueda y comparación *BLAST SEARCH*.



## RESULTADOS

### 1. RESCATE ALÉLICO DE LA MUTACIÓN *lyt1* DE *Saccharomyces cerevisiae*.

La mutación *lyt1* fue aislada por Cabib y Durán gracias a su capacidad de conferir fenotipo autolítico termosensible a cepas de la levadura *S. cerevisiae* (Cabib y Durán, 1975).

Resultados de complementación fenotípica indican que la mutación *lyt1* se encuentra en el gen *CDC15* (Yuste, 1995). La localización de la mutación en el gen *CDC15* se encuentra avalada por el hecho de que el diploide heterocigótico *cdc15-1/lyt1*, presenta defectos fenotípicos similares al mutante *lyt1* (Yuste, 1995). Sin embargo, la prueba definitiva para demostrar esta afirmación la hemos de encontrar en el rescate y secuenciación de la mutación *lyt1* y su posterior sustitución en una cepa silvestre.

El conocimiento de la localización de la mutación *lyt1* dentro del gen *CDC15* puede revelar información acerca de la topología de la proteína Cdc15p, que podría permitir la definición de un dominio funcional o estructuralmente importante para dicha proteína; y en definitiva, aportaría valiosa información, determinante para el esclarecimiento del mecanismo molecular en que se encuentra involucrado el producto del gen *CDC15*.

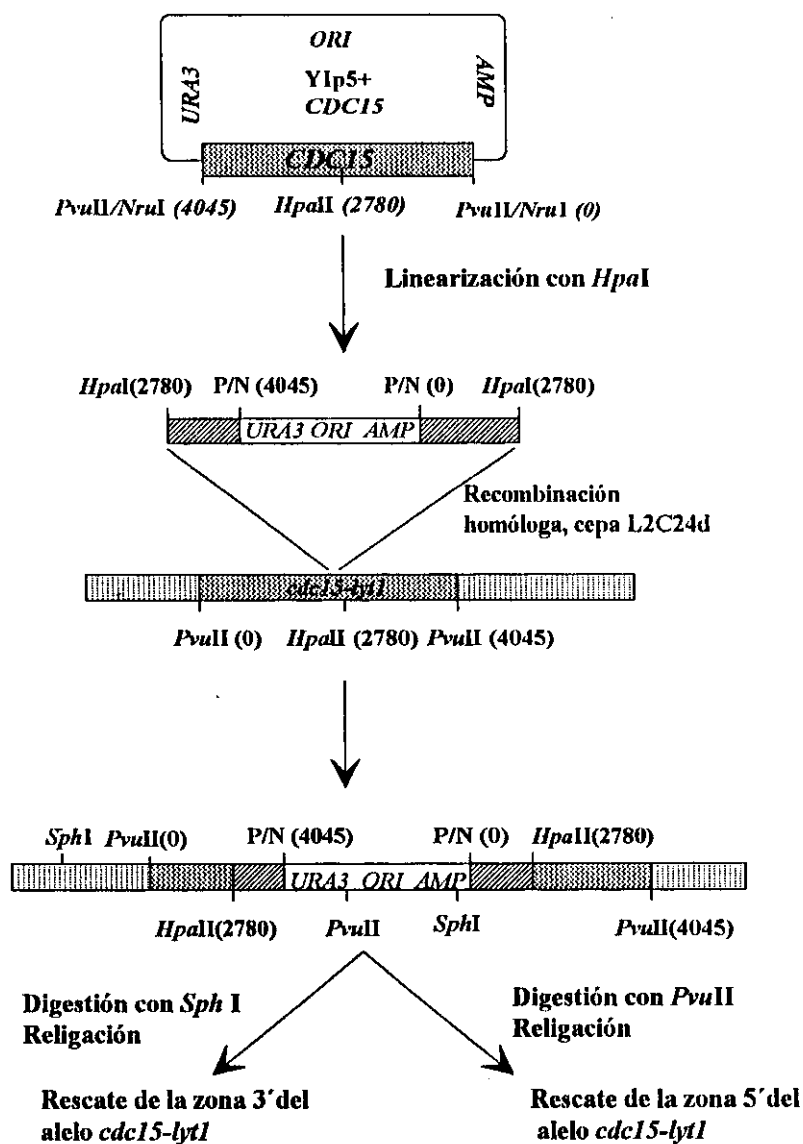
#### 1.1. ESTRATEGIA DEL RESCATE ALÉLICO.

##### 1.1.1. Recuperación del alelo mutado mediante la integración del alelo silvestre con el plásmido YIp5.

La presente estrategia consiste en introducir, por recombinación homóloga, un alelo silvestre del gen *CDC15* a través del vector integrativo YIp5. La recuperación del alelo mutado se realizará obteniendo el DNA genómico y cortándolo con una enzima de restricción apropiada, de modo que, al religarlo, los únicos fragmentos capaces de conferir resistencia a ampicilina, después de ser transformados en *E. coli*, serán aquellos que porten el vector YIp5 junto con el alelo mutante deseado (figura 9).

El gen *CDC15* se encuentra contenido en el fragmento *PvuII/PvuII* de 4 kb que resulta de cortar el plásmido pBS9 con esta enzima de restricción (Schweitzer y Philippsen, 1991). El fragmento en cuestión, se introdujo en el punto *NruI* del plásmido YIp5 eligiéndose la orientación adecuada. La construcción se linearizó por *HpaII*, diana de corte interna en el gen *CDC15*. Se transformó la construcción linearizada en la cepa L2C24d. Se obtuvieron colonias capaces de crecer en medio sin uracilo, lo que indica que han integrado la construcción. Se extrajo el DNA genómico y se digirió con *SphI* y con *PvuII*, como se detalla en la figura 9, se ligaron y transformaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Pero ninguno de los plásmidos rescatados

mediante esta aproximación contenía la construcción deseada, lo cual nos obligó a buscar una nueva estrategia para el abordaje del rescate alélico.



**Figura 9:** Estrategia del rescate del alelo *lyr1* mediante la integración del alelo silvestre con el plásmido YIp5.



### 1.1.2. Recuperación del alelo mutado por PCR.

El gen *CDC15* es un gen de tamaño relativamente elevado, en torno a 4 kb. Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta la técnica de amplificación por PCR, se decidió abordar la amplificación del alelo mutado del gen *CDC15* en tres partes (figura 10).

Primero, se amplificó la zona 3' del gen, para lo cual se diseñó un oligonucleótido (oligonucleótido 1B de materiales y métodos) en la secuencia terminadora del gen, a 3635 pares de bases del inicio del fragmento que contiene el gen; en este oligonucleótido se introdujo un punto de corte *HindIII*. El otro oligonucleótido se diseñó conteniendo el punto de corte *HindIII* que se encuentra a 2340 pares de bases del inicio del fragmento que contiene al gen (oligonucleótido 1A). La amplificación se realizó sobre DNA genómico de la cepa L2C24d, obteniéndose una banda de 1.3 kb que corresponde con el tamaño esperado. El amplificado se cortó con *HindIII* y se introdujo en el vector pBS9 y pJJ1 (YEp352 con el inserto *PvuII/PvuII* de 4 kb en el punto *NruI*), los cuales contienen el gen *CDC15* y en los que, previamente, se había eliminado el fragmento *HindIII/HindIII* equivalente al amplificado. De este modo se obtuvieron nuevos plásmidos que poseen el gen *CDC15* completo, pero cuya zona 3' es un amplificado de PCR del alelo *lyt1*. Con estos plásmidos se transformó la cepa L2C24d. Ambos fueron capaces de complementar perfectamente el fenotipo lítico termosensible característico de los mutantes de la estirpe *lyt1*, indicando que la mutación buscada no se encuentra en el fragmento *HindIII/HindIII* de la zona 3' del gen.

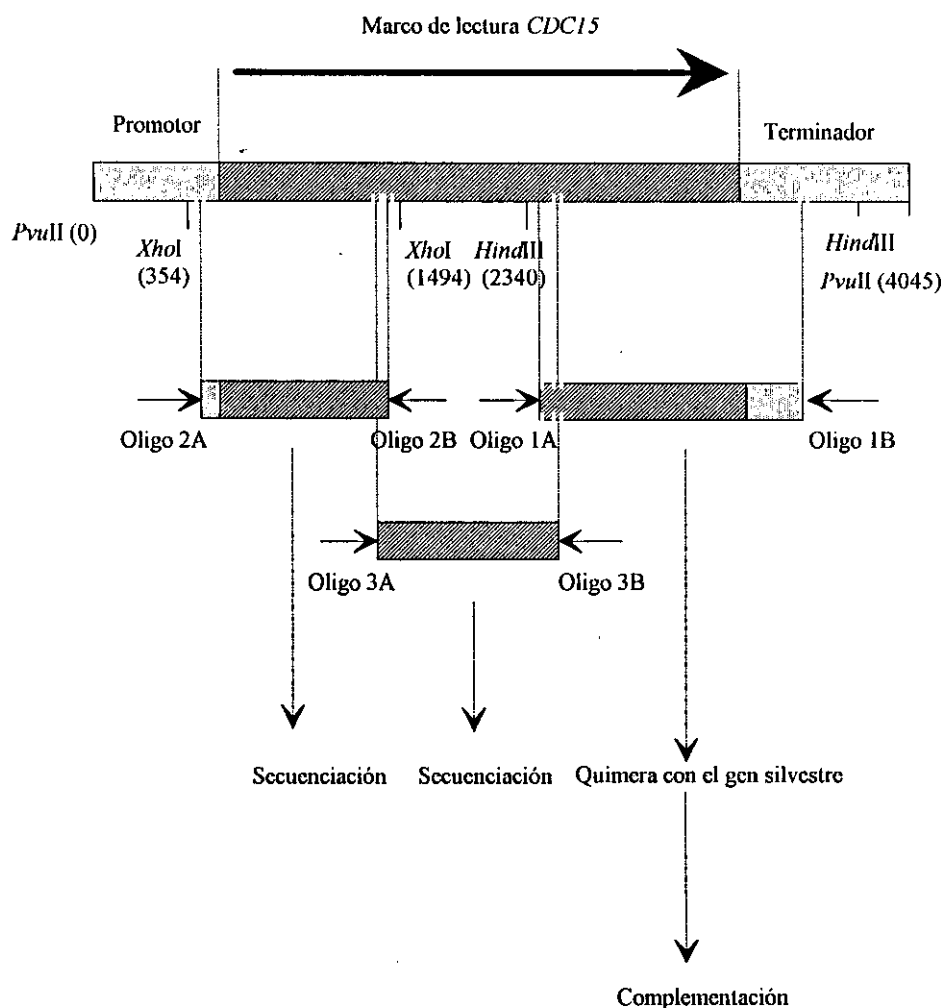
El siguiente fragmento que se amplificó corresponde a la zona 5' del gen *CDC15*. En este caso los oligonucleótidos diseñados contienen la diana de corte para la enzima *XhoI*, que se encuentra a 354 pares de bases del inicio de la secuencia que contiene al gen (oligonucleótido 2A) y el punto *XhoI*, que se encuentra a 1494 pares de bases del inicio (oligonucleótido 2B). Se logró un amplificado de 1.1 kb que se decidió secuenciar debido a la imposibilidad de realizar un gen híbrido con él, habida cuenta de la existencia de otro punto *XhoI* en la secuencia del gen *CDC15*. El amplificado se clonó en el vector pT7Blue. Para poder abordar su secuenciación, se dividió en dos fragmentos más pequeños mediante tratamiento con las enzimas *XhoI/SacI*, ambos fragmentos de 0.4 y 0.7 kb, se introdujeron en el vector pBluescript SK. El análisis de la secuencia no reveló ningún cambio con respecto a la secuencia del amplificado de la cepa silvestre control, que fue secuenciada en paralelo, ni con la secuencia publicada del gen *CDC15*.

Para amplificar la zona interna que resta, se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos, el primero de los cuales (oligonucleótido 3B), incluye una diana para la enzima *HindIII* que se encuentra a 2340 pares de bases del inicio. Se diseñó de modo que cubriese al oligonucleótido 1A usado para la amplificación del extremo 3' del gen. El segundo (oligonucleótido 3A) se diseñó cubriendo al oligonucleótido 2B y se introdujo en él una diana *HindIII*, la cual nos permitió clonar el amplificado, de entorno a 0.9 kb, en el vector pBluescript SK y abordar su secuenciación. La secuenciación reveló una única mutación puntual, el cambio de una G en la posición 1639 por una A. Esta mutación responde al mecanismo de acción descrito para el etilmetanosulfonato que metila la G haciéndola aparear erróneamente con una T, en lugar de con una C (Strather, 1981).

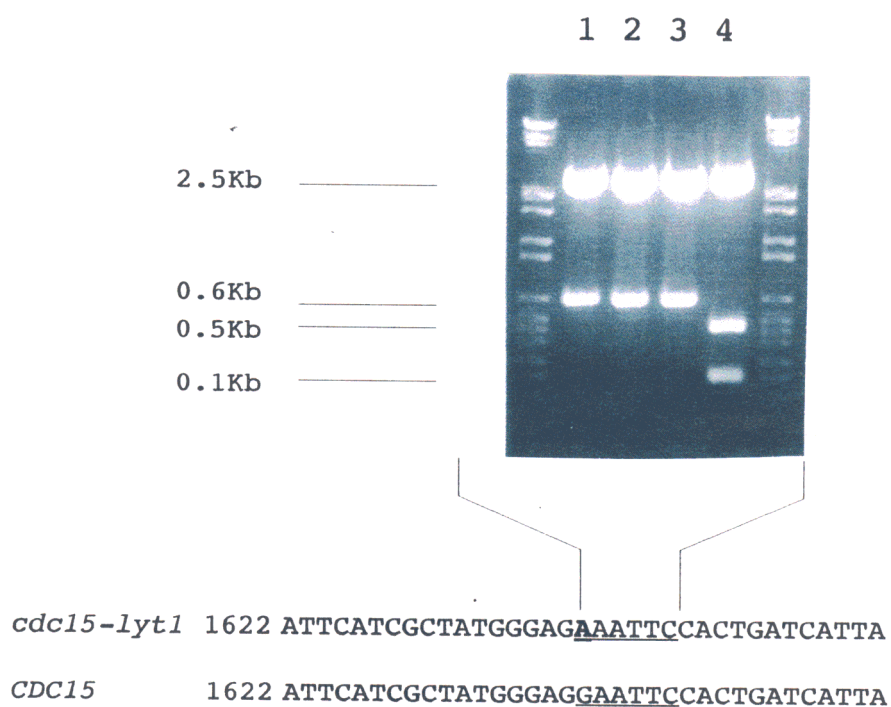
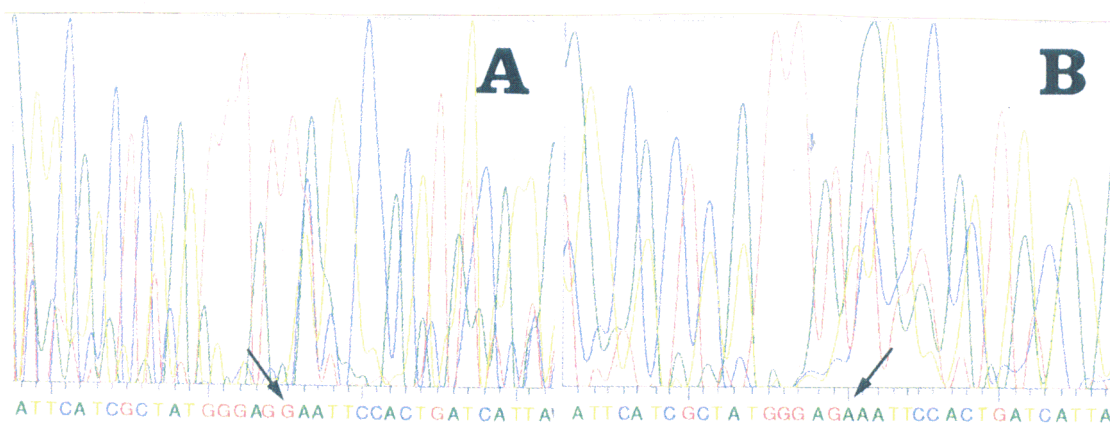
Para eliminar la posibilidad de que esta mutación haya sido incorporada por la polimerasa en la PCR se secuenciaron clones provenientes de tres reacciones distintas de PCR, en todos

los casos apareció el cambio G/A en la base 1639 descrito anteriormente. Para comprobar que no se trata de un error en la secuencia publicada del gen *CDC15*, se llevó a cabo una amplificación por PCR a partir del DNA genómico de una cepa silvestre YPH499, con los oligonucleótidos 3A y 3B. La secuenciación del fragmento amplificado de la cepa YPH499 desveló una G en la posición 1639, eliminando la posibilidad de un error en la secuencia publicada.

Analizando el mapa de restricción del gen *CDC15*, se observó que la posible mutación hallada se encuentra en un punto de corte para la enzima de restricción *EcoRI*. Así pues, se tomaron los amplificados que se obtuvieron usando como molde la cepa mutante L2C24d y como control el amplificado de la cepa silvestre YPH499, todos ellos clonados en el vector pBluescript SK, y se digirieron con *EcoRI*. El producto de la reacción se analizó electroforéticamente en un gel de agarosa. El resultado se muestra en la figura 11, donde puede observarse la desaparición de un punto de corte *EcoRI* en los amplificados de la cepa mutante, pero no en el amplificado de la cepa silvestre.



**Figura 10: Estrategia del rescate del alelo *lyt1*, amplificación por PCR**



**Figura 11:** Imagen superior: secuencia del fragmento amplificado por PCR de la cepa silvestre YPH499 (A). Secuencia amplificada de la cepa mutante L2C24d (B). Imagen inferior: electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados introducidos en el vector pBluescript SK y cortados con *EcoRI*. Las tres primeras calles corresponden a diferentes amplificaciones de la cepa L2C24d, la calle 4 corresponde al DNA amplificado de la cepa silvestre YPH499. Subrayada aparece la secuencia reconocida por *EcoRI* y en negrita la base mutada en la cepa L2C24d.

## 1.2. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN RESCATADA.

La única mutación encontrada en el gen *CDC15* define un nuevo alelo mutante de este gen, que fue denominado *cdc15-lyt1*. El producto del nuevo alelo mutante exhibe un residuo de glutámico en la posición 410, en lugar de la glicocola que presenta la proteína silvestre. La mutación está localizada en la zona no quinasa de la proteína Cdc15p. Cabe reseñar que todos los alelos mutantes termosensibles del gen *CDC15*, descritos hasta el momento, presentan las mutaciones en el dominio quinasa (Philippsen, comunicación personal; Shirayama y col., 1996).

La peculiaridad en la localización de la mutación nos animó a realizar una búsqueda en las bases de datos para determinar si existe alguna secuencia homóloga con la zona en que se localiza la mutación *lyt1*. La base de datos usada es la base de datos del EMBL, a través del programa de búsqueda *Blast Search*. Únicamente se encontró una secuencia homóloga, que corresponde al gen *cdc7*<sup>+</sup> de *Schizosaccharomyces pombe*, gen clonado y descrito por el Dr. Simanis y posible homólogo del gen *CDC15* en *S. pombe* (Fankhauser y Simanis, 1994).

Los genes *CDC15* y *cdc7*<sup>+</sup> presentan elevada similitud en su zona 5' (46% de residuos idénticos y 66% de residuos similares estructuralmente); es decir, las proteínas que codifican poseen similitud en su dominio quinasa. Sin embargo, dentro de sus dominios no quinasa, únicamente presentan similitud en la región donde se halla la mutación del alelo *cdc15-lyt1* (figura 12). Este resultado implica a esta pequeña zona conservada, al menos, en el mantenimiento de la estructura activa de ambas proteínas.

Cdc15-lyt1p	405	-	F	I	A	M	G	<b>D</b>	I	P	L	I	I	K	F	E	H	L
Cdc15p	405	-	F	I	A	M	G	<b>G</b>	I	P	L	I	I	K	F	E	H	L
cdc7	601	-	V	C	F	A	G	<b>G</b>	L	P	L	M	L	S	F	L	N	R

**Figura 12:** Secuencia de aminoácidos de la región donde se encuentra la mutación del alelo *cdc15-lyt1*. Comparación con la secuencia homóloga del gen *cdc7*<sup>+</sup> de *Schizosaccharomyces pombe*.

### 1.3. SUSTITUCIÓN DEL ALELO *cdc15-lyt1* EN UNA CEPA SILVESTRE.

Para comprobar que la mutación rescatada es la responsable del fenotipo de los mutantes de la estirpe *lyt1*, intentaremos sustituir, en una cepa silvestre, el alelo funcional del gen *CDC15* por el alelo *cdc15-lyt1* y comprobar que la cepa silvestre con el alelo mutante adquiere el fenotipo autolítico termosensible característico de las cepas de la estirpe *lyt1*.

#### 1.3.1. Estrategia para la sustitución del alelo silvestre por el alelo mutante *cdc15-lyt1*.

La estrategia general que se ha empleado consiste en la integración del alelo mutante por recombinación homóloga, a través del vector integrativo YIp5. Seguidamente, se fuerza la pérdida del marcador del plásmido y se seleccionan aquellos clones que, junto al marcador del plásmido y debido a una nueva recombinación, hayan eliminado el alelo silvestre.

No disponemos del alelo *cdc15-lyt1* completo, debido a que el rescate del mismo se realizó mediante varias amplificaciones por PCR, como se detalla anteriormente. Así pues, antes de abordar la sustitución alélica fue necesario reconstruir el alelo mutante completo. Para ello, en el gen silvestre se sustituyó la zona en que se encuentra la mutación, por un fragmento amplificado por PCR que porta dicha mutación *lyt1*.

Con este objetivo se diseñó un par de oligonucleótidos, uno interno al gen *CDC15* (oligonucleótido 2hA) que contiene el punto de corte para la enzima de restricción *SalI* (1248 de la secuencia del gen). El otro oligonucleótido fue diseñado en la zona del terminador del gen y en él se introdujo una diana para la enzima *SalI*. Se obtuvo un amplificado de PCR de 2.4 kb, que se clonó en el vector pT7Blue. Se dispone del gen *CDC15* introducido en el plásmido YIp5 en la orientación apropiada. Se cortaron ambos plásmidos con *SalI* y el fragmento de 2.4 kb, que porta la mutación *lyt1*, se intercambió por el proveniente del gen silvestre y se introdujo en el vector YIp5 que posee el resto del gen *CDC15*. Se seleccionó la orientación adecuada. La construcción fue linearizada mediante el tratamiento con la enzima de restricción *SnaBI*, la cual produce un único corte interno al gen *CDC15*. Con la construcción así conseguida se transformó la cepa 1783 de *S. cerevisiae*.

Previamente, se comprobó la fidelidad de la amplificación por PCR. Para ello, el fragmento amplificado que porta la mutación se digirió con la enzima *HindIII*, obteniéndose un fragmento de 1.3 kb, que fue intercambiado por su equivalente del gen silvestre en el plásmido pBS9. La quimera se transformó en la cepa mutante L2C24d, mostrando capacidad para complementar la termosensibilidad, lo cual indica que, si existiera algún error en la secuencia, éste no manifiesta implicaciones funcionales y por tanto el DNA amplificado es válido para nuestros propósitos. El fragmento que no fue comprobado mediante la quimera se obtuvo tratando el fragmento amplificado con *SalI* y *HindIII*; el fragmento de 1.1 kb así obtenido se introdujo en el vector pBluescript SK para su secuenciación, ratificándose la mutación del alelo *cdc15-lyt1* y asegurándonos la ausencia de otros cambios en la secuencia nucleotídica, respecto de la secuencia del gen *CDC15* publicada, como consecuencia de la reacción de amplificación.

La estrategia de la sustitución alélica, así como la comprobación de la fidelidad de la amplificación, se encuentran detalladas en la figura 13.

Las células de la cepa 1783 capaces de dar lugar a una colonia en un medio de cultivo sin uracilo han incorporado en su genoma la construcción linearizada del vector YIp5 con el alelo *cdc15-lyt1*. Estas células poseen los dos alelos del gen *CDC15*, uno silvestre y otro portador de la mutación *lyt1*. Para terminar la construcción de la cepa sustituida, se obligó a las células a expulsar la copia silvestre del gen, permitiendo crecer a los distintos transformantes en medio sin selección auxotrófica durante dos turnos de 48 horas, seguidamente, se sembraron por estría en medio mínimo, al que se añadieron todas las auxotrofias de la cepa junto con ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), un análogo estructural del uracilo. El 5-FOA puede ser metabolizado por las células que tienen intacta la ruta de síntesis de uracilo, dando lugar a un producto intermediario tóxico que evita su crecimiento. Por tanto, dicho medio de cultivo es selectivo para las células deficientes en la ruta de síntesis de uracilo y, en nuestro caso, es selectivo para aquellas células que han expulsado, por recombinación, uno de los alelos del gen *CDC15* junto con el gen *URA3* del YIp5.

Los clones que son capaces de crecer en 5-FOA, se pusieron a 37°C y todos ellos fueron capaces de crecer mostrando un fenotipo silvestre, idéntico a la cepa original, lo que indica que en ninguno de los casos se ha producido la sustitución del alelo silvestre del gen *CDC15* por el alelo *cdc15-lyt1*.

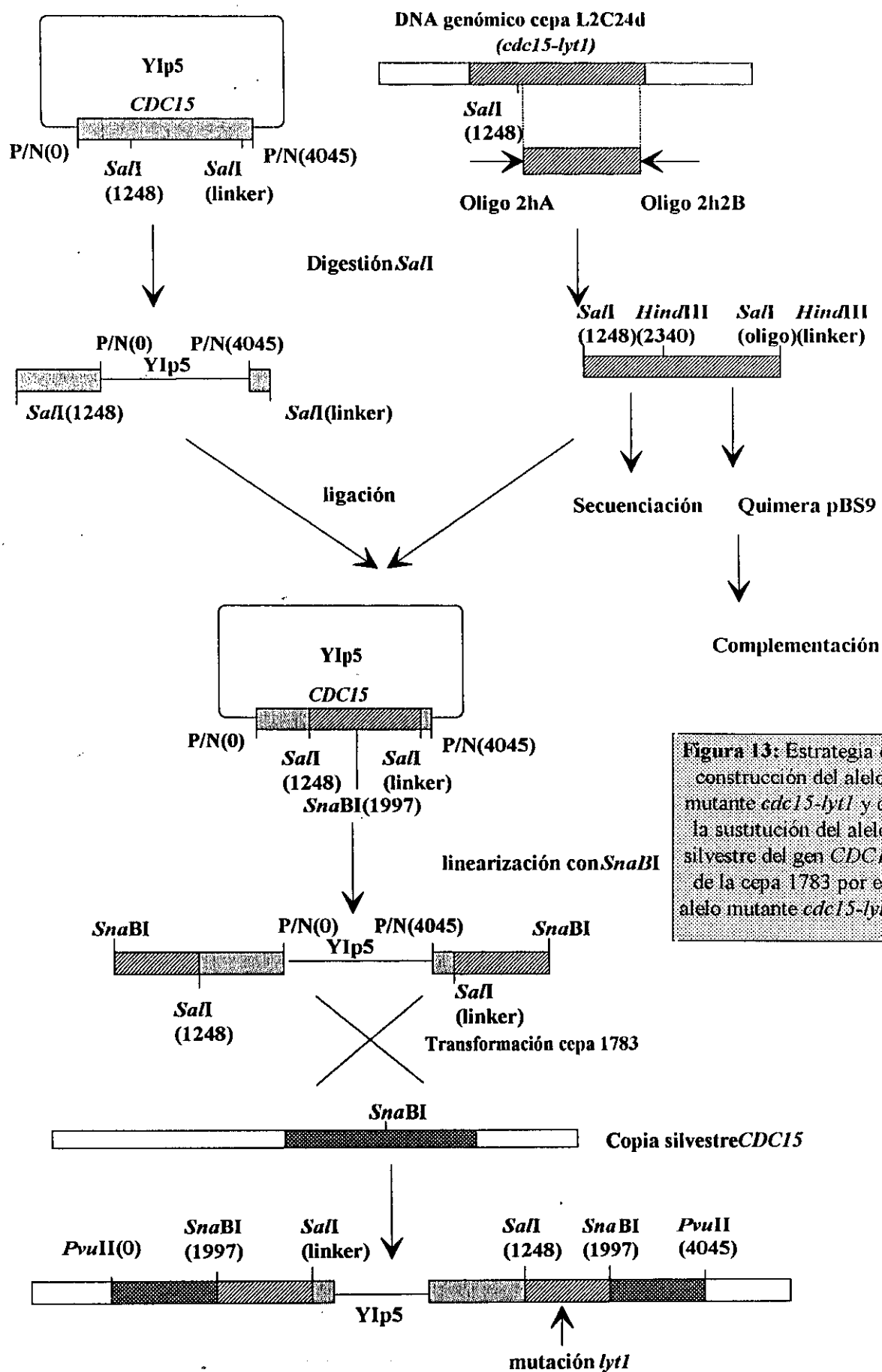


Figura 13: Estrategia de construcción del alelo mutante *cdc15-lyt1* y de la sustitución del alelo silvestre del gen *CDC15* de la cepa 1783 por el alelo mutante *cdc15-lyt1*.

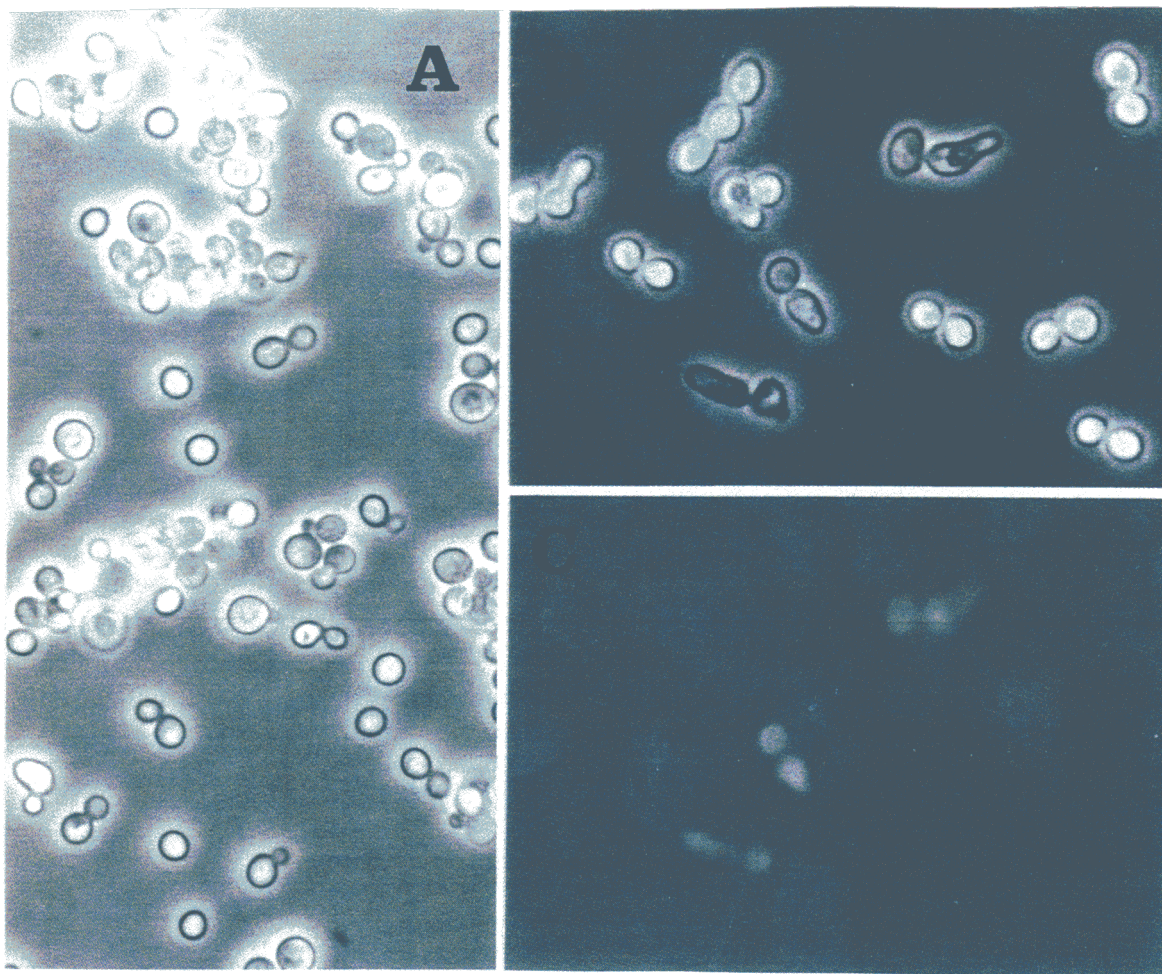


## 2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES *cdc15-lyt1*.

### 2.1. MORFOLOGÍA A 37°C DE LOS MUTANTES *cdc15-lyt1* DE *S. cerevisiae*.

Los mutantes *cdc15-lyt1* se caracterizan por presentar fenotipo lítico cuando son incubados a 37°C (Cabib y Durán, 1975; Molero y col., 1993).

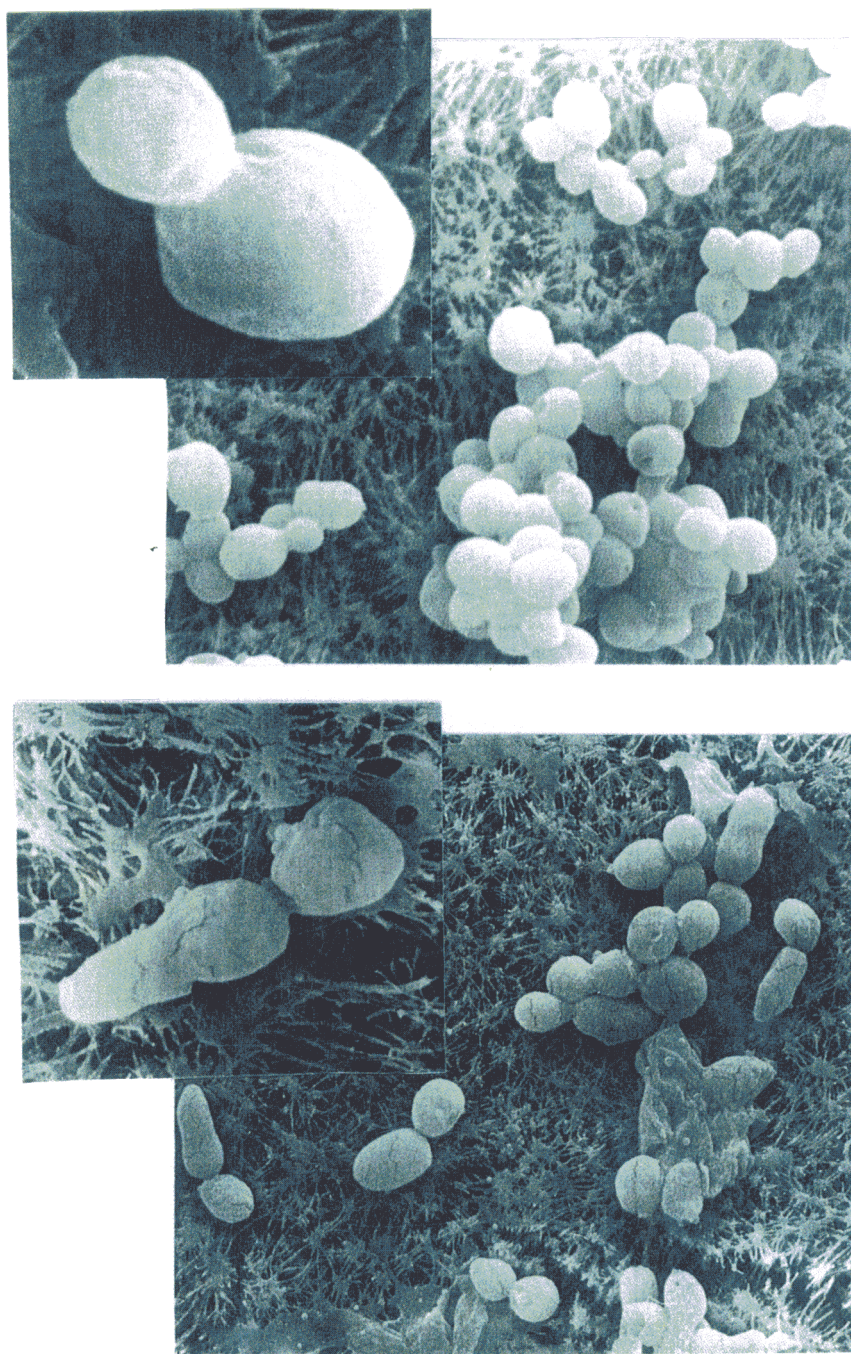
Con el fin de estudiar la morfología celular de los mutantes *cdc15-lyt1*, se creció la cepa L2C24d, portadora de dicha mutación, a 24°C en medio líquido YPD durante 16 horas, seguidamente se incubó a 37°C durante 6 horas. El fenotipo hallado se muestra en la figura 14. En ella, además de la lisis celular, puesta de manifiesto por la tinción de las células con yoduro de propidio, se observa una morfología celular aberrante, consistente en células con protuberancias apicales y forma similar a los *shmoos* propios del proceso de apareamiento.



**Figura 14:** Fotografía al microscopio de contraste de fases de la cepa L2C24d creciendo a 24°C (A). Fotografía al microscopio de contraste de fases de la cepa L2C24d tras 6 horas de incubación a 37°C (B). Imagen al microscopio de fluorescencia, tinción con yoduro de propidio de la imagen B (C).



Para completar la caracterización morfológica de los mutantes *cdc15-lyt1*, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido. Con este objetivo, se creció un cultivo de la cepa L2C24d durante 16 horas a 24°C, seguidas de 6 horas de incubación a 37°C. Tras la incubación a temperatura restrictiva, se prepararon las células para su observación al microscopio electrónico de barrido, siguiendo el protocolo que se detalla en el capítulo de materiales y métodos. Los resultados aparecen en la figura 15.



**Figura 15:** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa L2C24d creciendo a 24°C (Arriba). Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa L2C24d tras ser incubada 6 horas a 37°C (Abajo). En la imágenes generales 1 cm corresponde a 5  $\mu\text{m}$ , en los detalles 1 cm corresponde a 2  $\mu\text{m}$  en el mutante a 37°C y a 1  $\mu\text{m}$  en el mutante a 24°C.

## 2.2. POLARIDAD EN EL MUTANTE *cdc15-lyt1* A 37°C.

La levadura *S. cerevisiae* posee una pauta morfogenética de polaridad que determina el lugar de aparición de la yema incipiente. En general, las cepas haploides de este organismo orientan la gemación según un patrón de polaridad axial, es decir, la nueva yema emerge de forma contigua a la anterior gemación en el caso de la célula madre y contigua a la cicatriz de nacimiento en el caso de la célula hija (Chant, 1994; Chant y Pringle, 1995). Por el contrario, las cepas diploides desarrollan un patrón de polaridad bipolar; es decir, la célula hija gema por el polo opuesto a su cicatriz de nacimiento (Chant, 1994; Chant y Pringle, 1995), mientras que la célula madre puede abordar la nueva gemación de forma distal o contigua a su última gemación, dependiendo del tiempo que haya invertido en superar la fase G1 (Roemer y col., 1996).

### 2.2.1 Estudio de la polaridad en una cepa haploide de *S. cerevisiae* con la mutación *lyt1*.

Como puede observarse en las figuras 14 y 15, la cepa L2C24d cuando crece a 24°C posee un patrón de polaridad axial, propio de su condición de haploide. Sin embargo, cuando el crecimiento ocurre a 37°C, el patrón de desarrollo, aparentemente, se torna distal en una de las células, mientras que la otra pierde la capacidad de gemar.

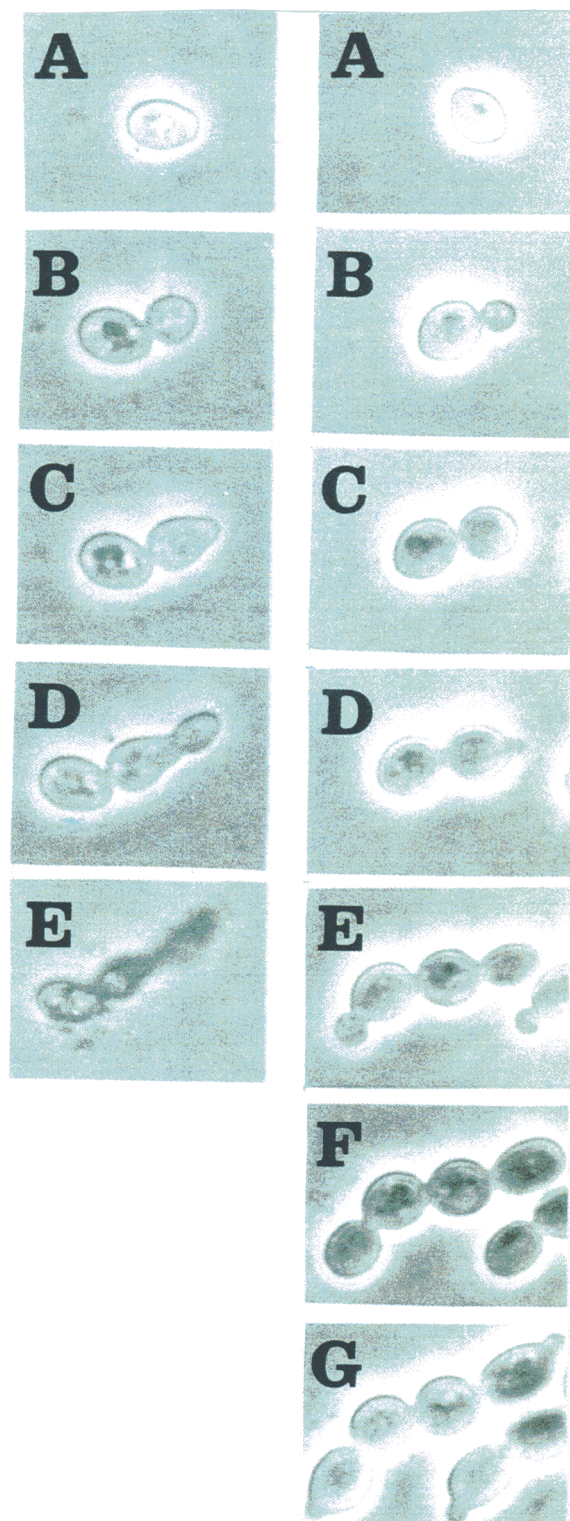
Para determinar qué célula -madre o hija- desarrolla la estructura apical aberrante descrita en el apartado anterior y qué célula pierde la capacidad de gemar; se creció un cultivo de la cepa L2C24d a 24°C, disponiéndose las células sobre una lámina de YPD sólido de 1 mm de espesor que fue colocada entre un portaobjetos y un cubreobjetos y sellada con parafina líquida para evitar la deshidratación. Esta estructura se mantuvo a 37°C por medio de una pletina termostatzada acoplada a un microscopio de contraste de fases. De este modo se observó el desarrollo, a temperatura restrictiva, de células individuales de la cepa mutante L2C24d.

Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 16, donde la secuencia fotográfica indica que es la célula hija la que genera la estructura apical aberrante, mientras que es la célula madre la que pierde la capacidad de producir una nueva yema. Estos estudios se llevaron a cabo en un total de 37 células, exhibiendo todas ellas idéntico comportamiento.

En la última imagen de la serie fotográfica de la figura 16, puede observarse cómo el final del proceso es la lisis celular, como fue descrito por Molero y colaboradores (1993).

Como prueba para respaldar las observaciones presentadas sobre la polaridad de las estructuras apicales aberrantes, se incubó, en idénticas condiciones, un cultivo de la cepa L2C24d, las células se tiñeron con blanco de calcoflúor poniéndose de manifiesto las cicatrices de gemación. El resultado que se obtuvo fue que de 35 células observadas, únicamente en una coincidieron en la misma célula las cicatrices de gemación y la estructura apical aberrante objeto de estudio, mientras que en el resto, la célula que genera la estructura apical anormal no presentó cicatrices de gemación. No hay que olvidar que las cicatrices de gemación aparecen únicamente en la célula madre, por tanto la célula recién generada (célula hija) ha de carecer de ellas (Chant y Pringle, 1995).





**Figura 16:** Secuencia fotográfica de una célula de la cepa L2C24d creciendo a 37°C. Las imágenes las recogimos a 0, 1, 2.5, 3.5 y 4.5 horas de incubación (Izquierda). Secuencia fotográfica de una célula de la cepa diploide MY1 creciendo a 37°C. Las imágenes las recogimos a 0, 1, 2, 3, 3.5, 4 y 5 horas de incubación (Derecha).

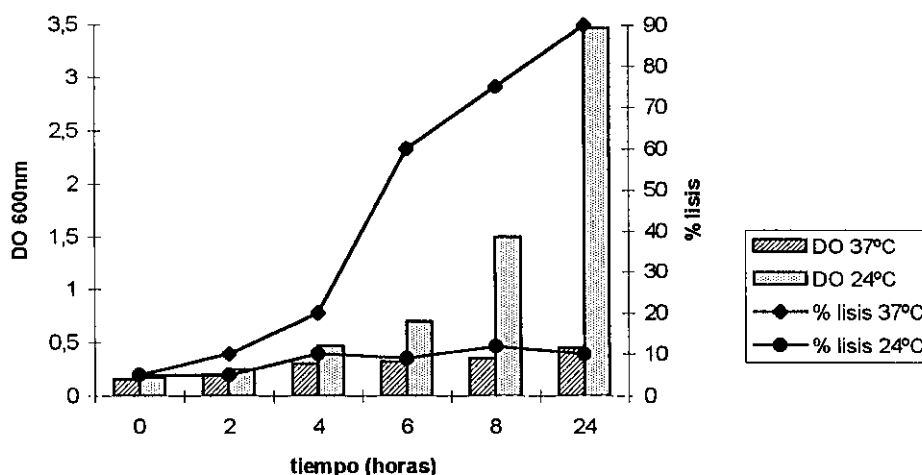
### 2.2.2. Estudio de la polaridad en una cepa diploide con ambos alelos del gen *CDC15* mutados.

Se utilizó la cepa diploide MY1 (*cdc15-lyt1/cdc15-1*) para llevar a cabo el ensayo descrito en el apartado anterior. Los resultados aparecen en la figura 16. En ella se ilustra cómo la célula hija, de acuerdo con el patrón general de polaridad de las cepas diploides, gema de forma distal. Del mismo modo, la célula madre lleva a cabo la gemación siempre de forma distal. Sin embargo, contrariamente a lo descrito, la gemación de la célula hija es cronológicamente anterior a la gemación de la célula madre (Roemer y col., 1996). El patrón siempre distal de la célula madre, así como la alteración en el orden de gemación, indican la posible existencia de un retraso en el ciclo celular de la célula madre.

Resulta notorio en la figura 16 que, al menos la cepa diploide MY1, presenta problemas en el proceso de separación celular, ya que las células permanecen encadenadas con forma arrosariada, fenómeno que será estudiado con mayor detalle en apartados posteriores.

### 2.3. LISIS EN UN MUTANTE *CDC15-lyt1* DE *S. cerevisiae*.

Se encuentra descrito en la bibliografía (Molero y col., 1993) que la incubación a la temperatura restrictiva de 37°C determina la lisis celular de los mutantes *cdc15-lyt1*. En la figura 17 se muestra la cinética de dicho proceso. Para ello, se creció la cepa L2C24d durante 16 horas en un matraz con 100 ml de YPD, el cultivo se dividió en dos alícuotas que se incubaron a 37 y 24°C respectivamente. Se extrajeron muestras a diferentes tiempos de incubación valorándose, primero la densidad óptica del cultivo a  $\lambda=600$  nm y segundo, el porcentaje de lisis celular mediante la tinción con yoduro de propidio.

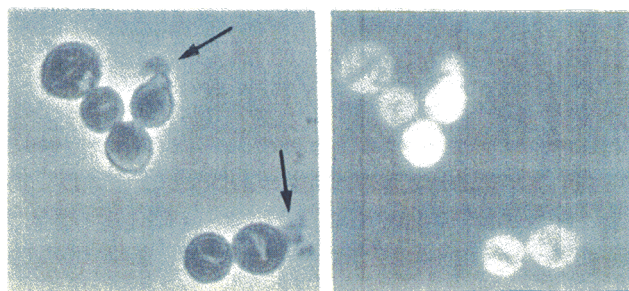


**Figura 17:** Cinética de crecimiento y de lisis de la cepa L2C24d.

### 2.3.1. Determinación del lugar por donde se produce la lisis de los mutantes *cdc15-lyt1*.

Nos propusimos determinar el lugar físico por el cual se produce la lisis de los mutantes *cdc15-lyt1*, ya que, en el caso de tratarse de un punto discreto, podría aportarnos información sobre los mecanismos implicados en la integridad celular que se ven afectados en estos mutantes.

Para ello se creció, en medio líquido, un cultivo de la cepa L2C24d durante 16 horas a 24°C, para después someterlo, durante 4 horas, a incubación a 37°C. Se tiñeron las células con yoduro de propidio y se observaron en un microscopio de fluorescencia y contraste de fases. En algunas de las células de la preparación se observó la liberación del contenido celular, que se pone de manifiesto por la tinción de los ácidos nucleicos con el yoduro de propidio. Se observó, además, la pérdida de la permeabilidad selectiva para el yoduro de propidio por parte de estas células, que aparecen, por consiguiente, teñidas también en su interior, resultado indicativo de la lisis celular. Como puede observarse en la figura 18, la liberación del material citoplásmico, y por tanto la pérdida de la integridad celular, tiene lugar por la estructura aberrante descrita anteriormente, área que, de acuerdo con nuestros resultados anteriores, se corresponde con el polo distal de la célula hija.



**Figura 18:** Determinación del lugar de lisis de la cepa L2C24d. Izquierda: imagen de contraste de fases. Derecha: imagen de fluorescencia de las células teñidas con yoduro de propidio.

## 2.4. EFECTOS DE LA ESTABILIZACIÓN OSMÓTICA DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL MUTANTE *cdc15-lyt1* Y EN OTROS MUTANTES EN EL GEN *CDC15* DE *S. cerevisiae*.

La adición al medio de cultivo de estabilizadores osmóticos es capaz de proteger de la autólisis a aquellos mutantes cuyo defecto primario radica en una deficiente organización de la pared celular o en alguna función directamente relacionada con ella (Torres y col., 1991).

De los resultados presentados en el apartado anterior se desprende que una pequeña variación en la presión osmótica del medio, como puede ser el montaje de las células en la solución de yoduro de propidio desde el YPD en que se encuentran creciendo, puede determinar su lisis. Gracias a esta pequeña variación osmótica a que fueron sometidas las células se pudo observar el fenómeno lítico *in situ*, ya que si la lisis hubiese sido previa, durante la incubación en el medio de cultivo, difícilmente se podría haber observado el material citoplásmico liberado por la zona donde la célula pierde la integridad.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos dispusimos a determinar cuál es el efecto, sobre el mutante *cdc15-lyt1* creciendo a 37°C, de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo como es el sorbitol a una concentración 1 M.

### 2.4.1. Efecto del sorbitol 1 M.

Para estudiar el efecto de la estabilización osmótica sobre nuestro conjunto de mutantes, y como ensayo previo, se realizó una cinética de crecimiento a temperatura restrictiva en medio con y sin sorbitol 1 M. Para ello, se crecieron las distintas cepas durante 16 horas en un matraz con 50 ml de YPD con o sin sorbitol 1 M. Seguidamente se incubaron a 37°C, extrayéndose muestras a diferentes tiempos y analizándose su densidad óptica ( $\lambda = 600$  nm) y la proporción de células lisadas por tinción con yoduro de propidio. Los resultados se muestran en la figura 19.

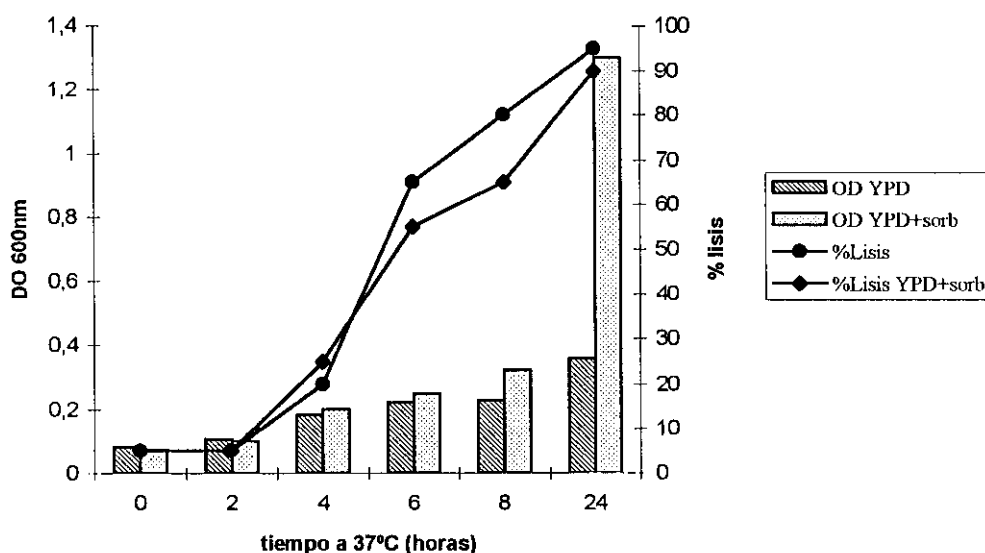
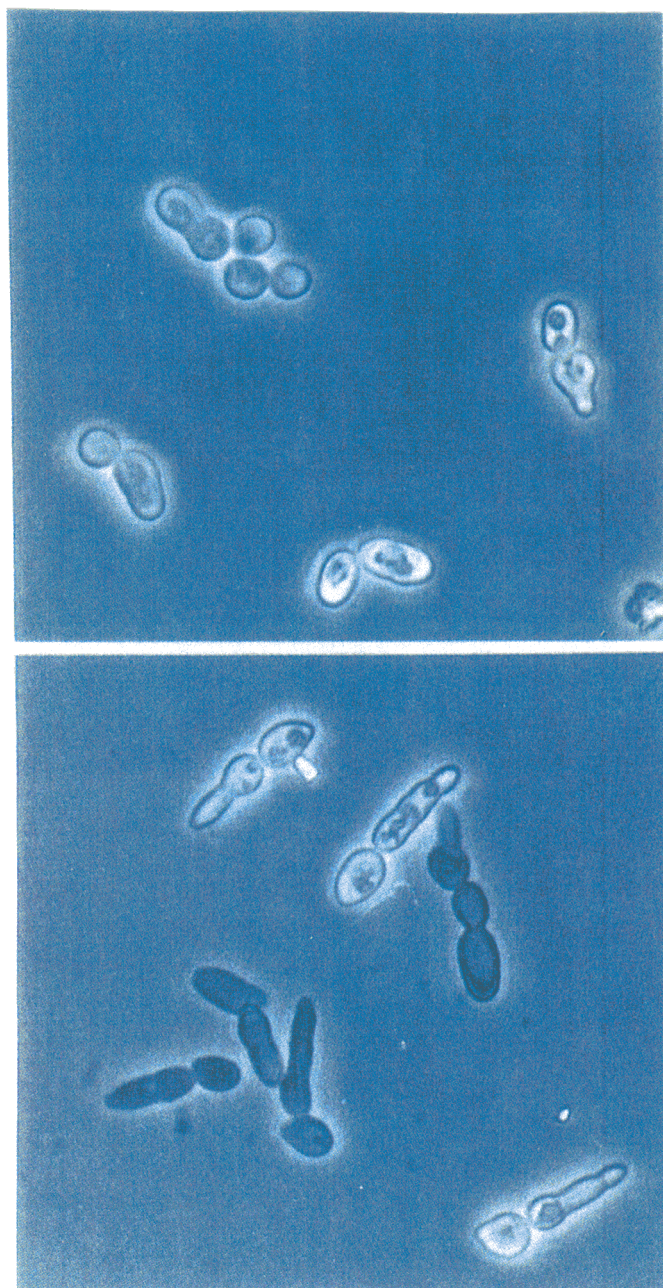


Figura 19: Cinética de lisis con y sin sorbitol 1 M de la cepa L2C24d.



En la figura 20 se muestran imágenes de contraste de fases de fases de la cepa L2C24d, después de ser incubada durante 6 horas a 37°C en presencia y en ausencia del estabilizador osmótico.




**Figura 20:** Fotografías de contraste de fases de la cepa L2C24d tras ser incubada a 37°C durante 6 horas. En medio YPD (Arriba) y en YPD más sorbitol 1 M (Abajo).

De los resultados presentados en las figuras 19 y 20 se desprende que la estabilización osmótica del medio con sorbitol 1 M no es capaz de suprimir la termosensibilidad de la cepa L2C24d. Sin embargo, la estabilización osmótica permite que la lisis celular se retrase ligeramente, lo que determina la aparición de un fenotipo similar, aunque más pronunciado, al observado cuando las células son crecidas sin sorbitol: aparecen estructuras apicales de tamaño más elevado y mayor proporción de células encadenadas. También nos llama la atención el hecho de que la estabilización osmótica del medio de cultivo permita que un significativo porcentaje de células, de las cepas haploides, se comporte de forma similar a como lo hacen las cepas diploides y den lugar a células encadenadas a modo de rosario. Idénticos resultados se obtuvieron en los diferentes fondos genéticos analizados y con los diferentes alelos de que se dispuso.

Con el fin de documentar en mayor profundidad la influencia del sorbitol 1 M sobre las cepas con el gen *CDC15* mutado, decidimos realizar un estudio fenotípico cuantitativo. Para ello se crecieron las distintas cepas en YPD y YPD más sorbitol 1 M durante 16 horas a 24°C, seguidamente se incubaron durante 6 horas a 37°C y se observaron al microscopio de contraste de fases. La cuantificación de las distintas estructuras celulares observadas se muestra en la tabla 10. De ella cabe destacar que el efecto del sorbitol en la formación de estructuras anormales en estos mutantes, no es sólo cualitativo sino también cuantitativo. Así pues, la proporción de células que muestran aberraciones apicales es muy superior en presencia del estabilizador osmótico.



Tabla 10:

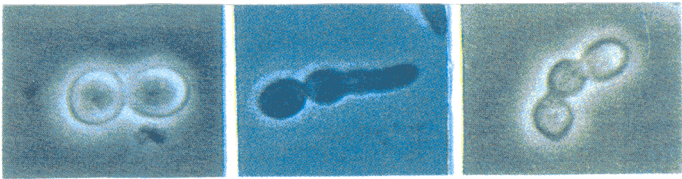
CEPA	MEDIO DE CULTIVO			
<b>L2C24d</b> ( <i>cdc15-lyt1</i> )	YPD	19% (50 cels)	79% (208 cels)	2% (6 cels)
<b>L2C24d</b>	YPD+Sorbitol	9% (44 cels)	55% (260 cels)	26% (171 cels)
<b>RH210</b> ( <i>cdc15-1</i> )	YPD	80% (466 cels)	18% (109 cels)	2% (10 cels)
<b>RH210</b>	YPD+Sorbitol	8% (26 cels)	43% (133 cels)	49% (152 cels)
<b>MY1</b> ( <i>cdc15-1/cdc15-lyt1</i> )	YPD	27% (70 cels)	45% (118 cels)	28% (74 cels)
<b>MY1</b>	YPD+Sorbitol	3% (8 cels)	27% (86 cels)	70% (224 cels)
<b>DU3</b> ( <i>lyt1/lyt1</i> )	YPD	56% (217 cels)	29% (112 cels)	15% (56 cels)
<b>DU3</b>	YPD+Sorbitol	12% (25 cels)	60% (125 cels)	28% (58 cels)
<b>DR1</b> ( <i>cdc15-1/cdc15-1</i> )	YPD	89% (225 cels)	11% (27 cels)	---- ( 1 cel)
<b>DR1</b>	YPD+Sorbitol	45% (25 cels)	38% (21 cels)	16% (9 cels)

#### 2.4.2. Efecto de otro estabilizador osmótico (NaCl 0.2 M).

Para asegurarnos de que los efectos que produce la adición al medio de cultivo de sorbitol 1 M mostrados en la tabla anterior, se deben a un aumento de la osmolaridad del medio y no a posibles interferencias del sorbitol con otros procesos celulares, se repitieron estos ensayos empleando como estabilizador osmótico NaCl a una concentración 0.2 M, concentración que confiere al medio una osmolaridad similar a la generada por el sorbitol 1 M.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 11.

Tabla 11:

CEPA	MEDIO DE CULTIVO			
L2C24d ( <i>lyt1</i> )	YPD	21% (40 cels)	76% (147 cels)	3% (6 cels)
L2C24d	YPD +NaCl	10% (20 cels)	59% (119 cels)	31% (64 cels)
RH 210 ( <i>cdc15-1</i> )	YPD	86% (143 cels)	11% (18 cels)	3% (5 cels)
RH 210	YPD +NaCl	18% (15 cels)	29% (25 cels)	53% (45 cels)

Como puede observarse, el efecto de la adición de NaCl 0.2 M al medio de cultivo es comparable al obtenido cuando el medio se estabilizó con sorbitol 1 M, indicando que los resultados conseguidos se deben a las características osmóticas que confieren estos solutos al medio de cultivo y, a su vez, excluyen la posibilidad de la interferencia del sorbitol con otros procesos celulares.

## 2.5. NATURALEZA DE LAS ESTRUCTURAS APICALES ABERRANTES DE LOS MUTANTES EN EL GEN *CDC15*.

Los resultados logrados hasta ahora muestran que la mutación en el gen *CDC15* determina, a temperatura restrictiva, la aparición de unas estructuras polar y morfogenéticamente anómalas en la zona apical de la célula hija, por las que acontece la lisis celular.

El gen *BUDI1*, también conocido como *RSR1*, codifica una GTPasa pequeña de la familia de las proteínas Ras (Bender y Pringle, 1989; Chant y Herskowitz, 1991). Los mutantes en este gen presentan un patrón de gemación al azar. Así pues, al producto del gen *BUDI1* se le ha implicado en la determinación del lugar por el que ha de producirse la nueva gemación, es decir, es el responsable de la orientación de la polaridad celular hacia un punto concreto de la célula. Del mismo modo, es responsable de la activación de otra GTPasa llamada Cdc42p, que se encarga de dirigir, hacia el punto marcado por Bud1p, el citoesqueleto de actina y con él,

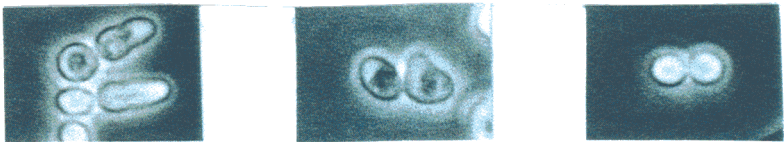
toda la maquinaria morfogenética que se precisa para el crecimiento de la yema (Chant, 1994; Chant y Stowers, 1995; Park y col., 1997).

Con los ensayos que se describen a continuación, nos propusimos determinar si las estructuras apicales aberrantes características de los mutantes en el gen *CDC15* corresponden a un intento de gemación polarmente erróneo. Si esta fuese la explicación, la localización de las estructuras aberrantes debería ser dependiente de las señales generales de polaridad celular determinadas por Bud1p.

La aproximación elegida consistió en estudiar, a temperatura restrictiva, la polaridad de un mutante en el gen *CDC15* en un fondo mutante del gen *BUD1*. Para ello se cruzó la cepa RH210 (*MAT $\alpha$* , *cdc15-1*, *ura3-52*) con la cepa JC223 (*MAT $\alpha$* , *bud1::URA3*, *ura3-52*), cedida amablemente por el Dr. John Chant de la Universidad de Harvard. Los diploides se obtuvieron por micromanipulación del cruzamiento, se dispusieron en un medio pobre en nitrógeno para permitir su esporulación. Se micromanipularon las ascas producidas, seleccionándose aquellas que eran capaces de crecer en medio sin uracilo y presentaban el fenotipo termosensible característico de los mutantes *cdc15-lyt1*.

De ese modo, se escogieron cuatro dobles mutantes *cdc15 bud1*, que se crecieron en un matraz de YPD durante 16 horas, tras las cuales se incubaron 6 horas a 37°C. Seguidamente se procedió al análisis de la polaridad de dichos dobles mutantes por microscopía de contraste de fases. Como cepa control se empleó un segregante producto de la misma micromanipulación, que porta únicamente la mutación *cdc15-1*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12:

CEPA			
	PROYECCIÓN APICAL	PROYECCIÓN NO APICAL	AUSENCIA DE GEMACIÓN
RH210 ( <i>cdc15-1</i> )	64% (110 cels.)	4% (6 cels.)	32% (56 cels.)
JJY1 ( <i>cdc15-1 bud1::URA3</i> )	27% (109 cels.)	44% (180 cels.)	29% (118 cels.)

De los resultados mostrados en la tabla 12 se deduce que el doble mutante *cdc15, bud1* deslocaliza el lugar de aparición de la estructura aberrante característica de la mutación en el gen *CDC15*. El resultado que se ha obtenido es indicativo de que la estructura apical aberrante objeto de estudio, responde a las señales generales que rigen la polaridad celular, lo que nos hace pensar que podríamos encontrarnos ante un nuevo intento de gemación por parte de la célula hija.

Otro aspecto remarcable reside en que, al igual que en el mutante sencillo *cdc15-1*, en el doble mutante *cdc15 bud1* la célula madre pierde la capacidad de gemar, con lo que la gemación anormal y con localización al azar tiene lugar, únicamente, en la célula hija.

## 2.6. TINCIÓN DE ACTINA DE MUTANTES *cdc15-lyt1*.

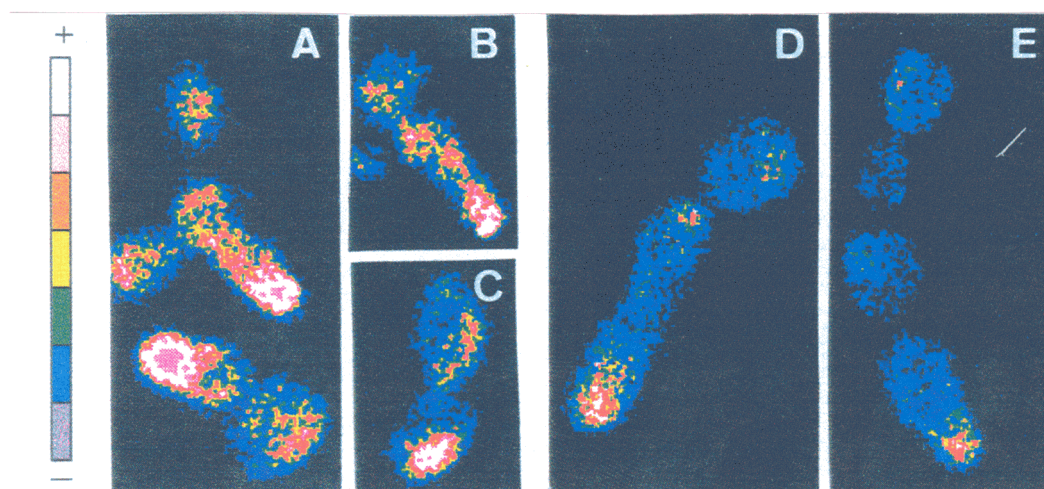
El crecimiento polarizado de las células de levadura precisa de la polarización del citoesqueleto subcortical de actina, la cual determina la secreción de precursores de la pared celular, y por tanto marca las zonas de crecimiento celular.

Al final de la anafase, momento de parada descrito para los mutantes en el gen *CDC15* (Schweitzer y Philippsen, 1991; Surana y col., 1993), la actina, en las células silvestres, se encuentra polarizada en la zona del septo para producir el crecimiento del mismo (Lew y Reed, 1993).

Deseábamos conocer cómo se encuentra dispuesto el citoesqueleto de actina en los mutantes *cdc15-lyt1* a temperatura restrictiva. Para ello se mantuvieron las células durante 6 horas a 37°C. Tras fijarlas, se tiñeron con faloidina conjugada con fluoresceína. La observación en el microscopio de fluorescencia revela que el citoesqueleto de actina se halla polarizado en las estructuras apicales del polo distal, lo cual resulta predecible si se piensa que es la zona donde se está produciendo el crecimiento. Sin embargo, no se observa polarización de la actina en la zona del septo. Este resultado indica que los mutantes en el gen *CDC15* no inician, y por tanto no llevan a cabo, la polarización de la actina a la zona del septo. El gen *CDC15* parece, pues, esencial para la correcta orientación del citoesqueleto de actina en el momento de la septación.

En la figura 21 se ilustran los resultados detallados anteriormente. Las imágenes, obtenidas por microscopía confocal, muestran como el citoesqueleto de actina, teñido con faloidina conjugada con fluoresceína, en un mutante *cdc15-lyt1* tras 6 horas de incubación a temperatura restrictiva, se halla polarizado en la zona apical de la estructura de gemación aberrante que muestra la célula hija.





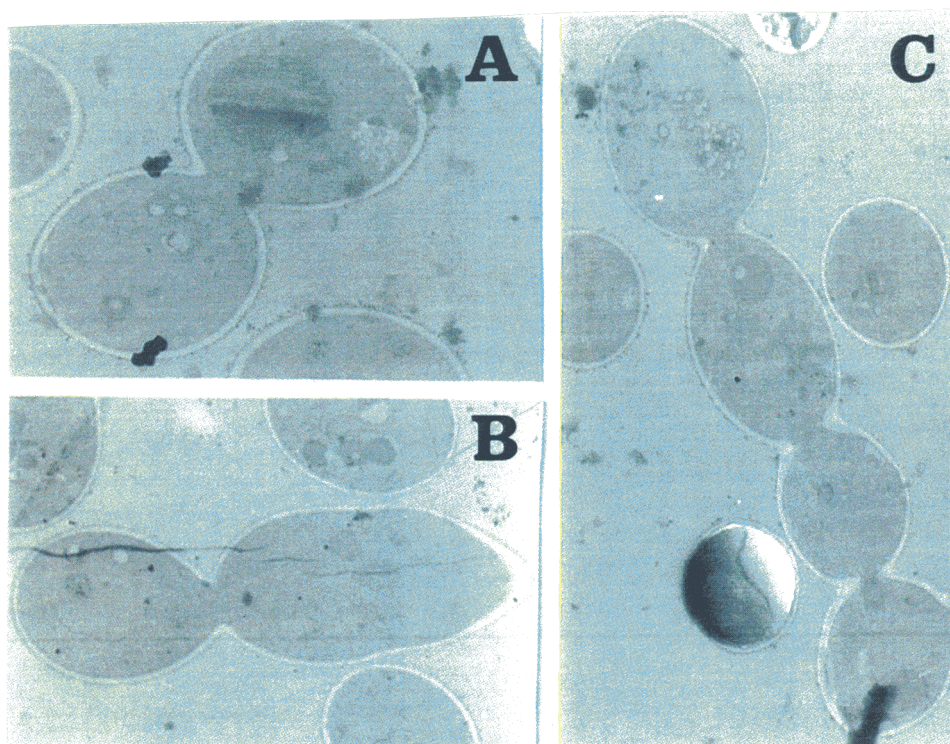
**Figura 21:** Imágenes de microscopía confocal de células con el citoesqueleto de actina teñido con faloidina conjugada con fluoresceína. Ceba L2C24d creciendo a 24°C (Izquierda). Ceba L2C24d tras ser incubada 6 horas a 37°C (Centro). Ceba MY1 tras ser incubada 6 horas a 37°C (Derecha).

## 2.7. ESTUDIO DE LA SEPTACIÓN DE LOS MUTANTES EN EL GEN *CDC15* A TEMPERATURA RESTRICTIVA.

En el apartado anterior se han descrito disfunciones de la morfogénesis en el área del septo de los mutantes en el gen *CDC15* cuando son incubados a temperatura restrictiva. Para estudiar más profundamente el desarrollo del proceso de septación se decidió llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de transmisión de estos mutantes.

En la figura 22 se muestran fotografías de secciones de células de las cepas L2C24d y MY1, después de ser sometidas a incubación a 37°C durante 6 horas. En todas ellas se observa cómo el proceso de septación ni siquiera ha sido iniciado. Así pues, parece claro que los mutantes en el gen *CDC15* son incapaces de iniciar, y por tanto de llevar a cabo, el proceso de septación.

El defecto en el inicio del proceso de septación es fácilmente explicable, dado que los mutantes en el gen *CDC15* no son capaces de polarizar la actina en la zona del septo, proceso previo indispensable para cualquier fenómeno de crecimiento celular.



**Figura 22:** Fotografías de microscopía electrónica de transmisión tras 6 horas de incubación a 37°C. Cepa haploide L2C24d (A y B). Cepa diploide MY1 (C).

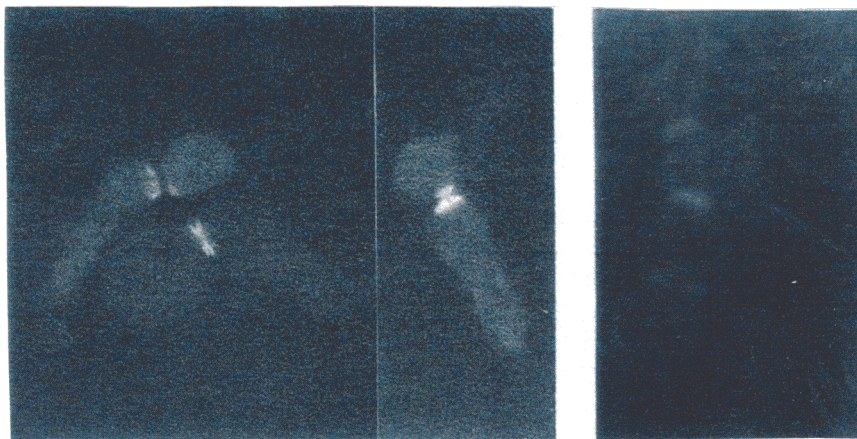


### 2.7.1. Disposición de las septinas en los mutantes *cdc15*.

A la vista de los resultados anteriores, donde se muestra el defecto en el proceso de septación que presentan los mutantes en el gen *CDC15*, se decidió estudiar cómo se encuentra la estructura de septinas en estos mutantes. Dicha estructura es esencial, entre otras funciones, para la correcta consecución del proceso de septación (Longtine y col., 1996), y su ausencia produce la formación de septos anómalos y deslocalizados (Cid y col., 1998).

La estrategia que se empleó para revelar el anillo de septinas fue la fusión, por el extremo carboxilo terminal de una de ellas, Cdc10p, a la proteína verde (Niedenthal y col., 1996). Esta construcción, en el plásmido pLA10, fue cedida amablemente por la Dra. Molina (este departamento).

Se transformó la cepa mutante L2C24d (*cdc15-lyt1*) con el plásmido pLA10, se crecieron distintos transformantes a 24°C durante 16 horas en matraces con YPD, seguidamente se incubaron a 37°C durante 6 horas para permitir la expresión del fenotipo típico de los mutantes en el gen *CDC15*. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 23. En ella podemos observar como el anillo de septinas se encuentra, aparentemente bien ensamblado, en la constricción entre la célula madre y la hija, sin embargo, en ningún caso aparece en el cuello entre la célula hija y el intento de gemación apical aberrante que presenta ésta.



**Figura 23:** Imágenes de fluorescencia de células de las cepas L2C24d (Izquierda) y MY1 (Derecha) transformadas con el plásmido pLA10 que porta el gen *CDC10* fusionado al gen de la proteína verde. Las células, después de crecerse durante 16 horas a 24°C, fueron incubadas a 37°C durante 6 horas.

## 2.8. TINCIÓN DE NÚCLEOS.

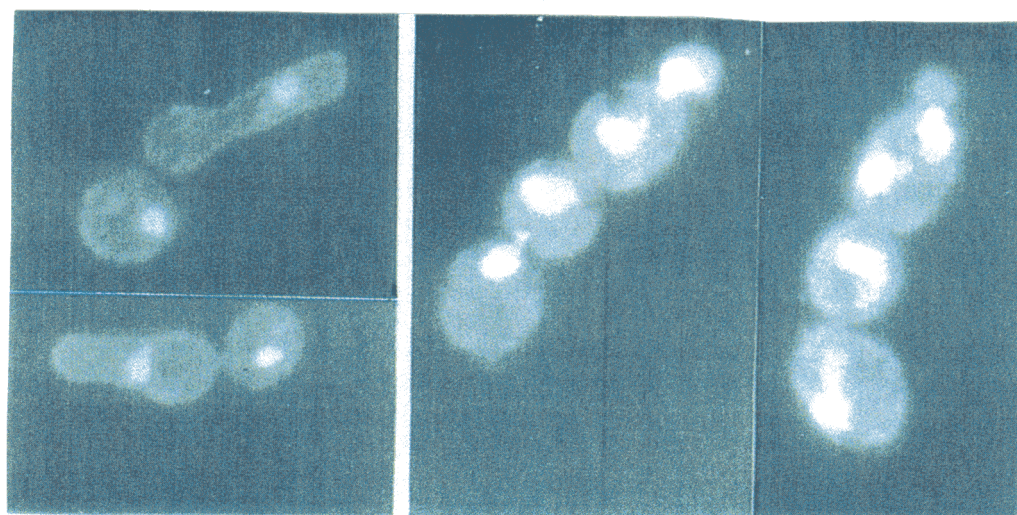
En la bibliografía se encuentra descrito que los mutantes en el gen *CDC15* son incapaces de superar la anafase mitótica, deteniendo su ciclo celular con la yema del tamaño de la célula madre (Culotti y Hartwell, 1971; Schweitzer y Philippsen, 1991; Molero y col., 1993; Surana y col., 1993). Sin embargo, los resultados que hemos expuesto hasta el momento, indican que los mutantes objeto de estudio, si bien presentan una parada en el ciclo celular al final de la anafase, son capaces de superarla abordando una nueva fase S (tabla 12), y por tanto un nuevo proceso de gemación, que, como se expuso anteriormente, es polarmente anormal (en cepas haploides) y morfogenéticamente erróneo, por lo que en última instancia determinará la lisis celular.

La superación de la parada en el ciclo morfogenético se encuentra documentada en los resultados anteriormente presentados. Sin embargo, con los resultados mostrados hasta el momento, no podemos discernir si, el ciclo nuclear supera la parada en anafase paralelamente a como lo hace el ciclo morfogenético o si, simplemente, estamos asistiendo a un desacoplamiento entre ambos ciclos.

Estos antecedentes nos llevaron a realizar un estudio preliminar de la dinámica del ciclo nuclear de los mutantes en el gen *CDC15*. Para ello, se crecieron las células durante 16 horas a 24°C y se dejaron expresar el fenotipo durante 6 horas a 37°C. Inmediatamente se fijaron y tiñeron los núcleos con yoduro de propidio. El resultado se muestra en la figura 25. En ella se observa cómo, al menos en la cepa diploide MY1, que a temperatura restrictiva da lugar a células encadenadas, el ciclo nuclear no se halla detenido, sino que se desarrolla paralelamente al morfogenético, lo que determina la aparición de un núcleo en cada una de las células unidas sin septar. En cuanto a la cepa haploide analizada, el núcleo de la célula que produce la estructura errónea, se encuentra en el cuello entre la célula hija y la estructura aberrante, lo que indica que, posiblemente, se encuentre en estadios iniciales de su separación, hecho que no se observa debido a la lisis que sufre la célula en ese momento.

Estos resultados indican que, contrariamente a lo descrito, tanto el ciclo nuclear como el morfogenético, son capaces de superar el punto de detención del ciclo en la anafase mitótica, al menos en las cepas diploides.





**Figura 24:** Tinción de núcleos con yoduro de propidio después de 6 horas de incubación a 37°C de la cepa haploide L2C24d (Izquierda) y la cepa diploide MY1 (Derecha).

## 2.9. CICLO NUCLEAR EN LOS MUTANTES DE LA ESTIRPE *lyt1*.

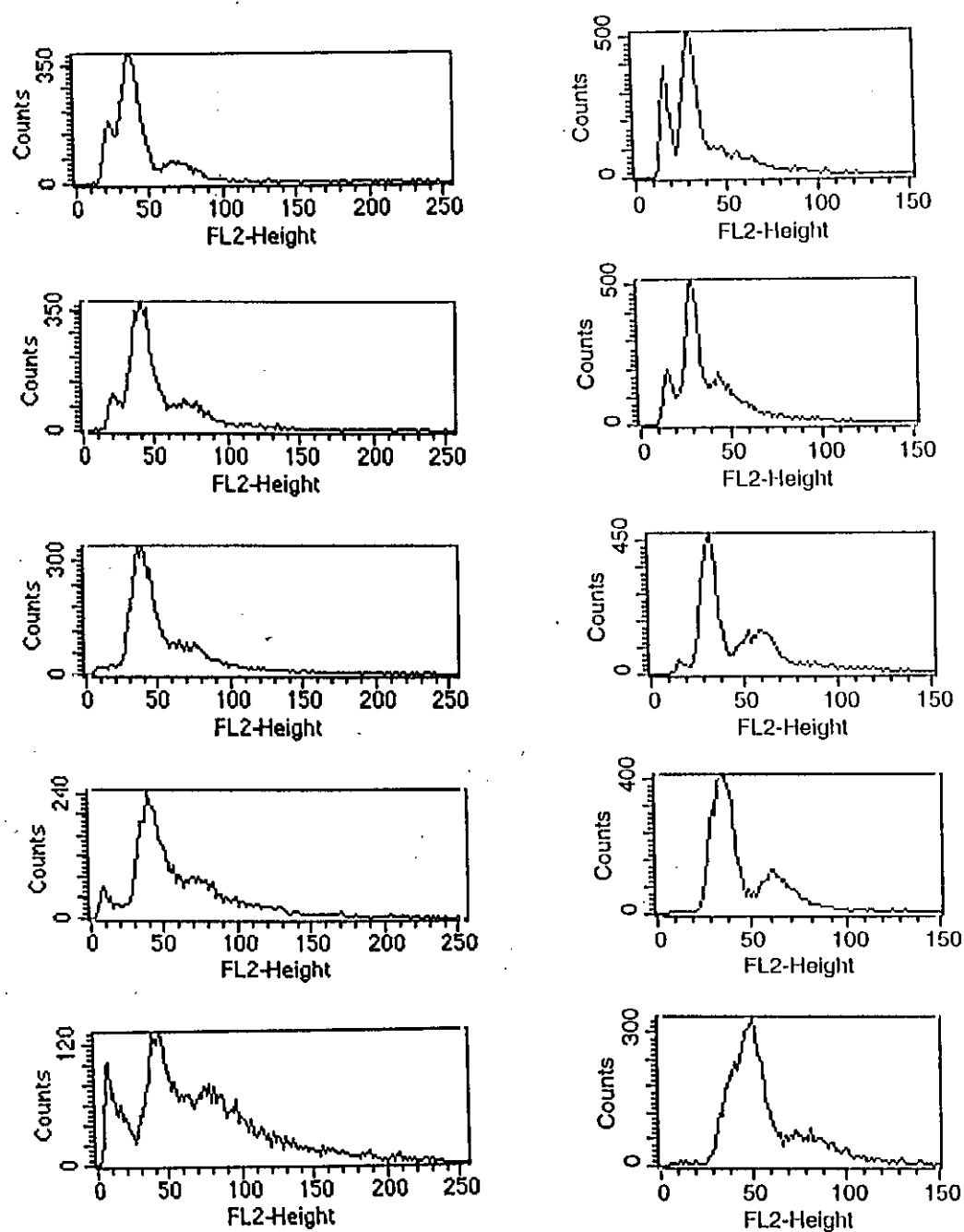
En las cepas diploides, como indican las tinciones de núcleos mostradas anteriormente, los ciclos morfogenético y nuclear discurren de forma paralela. Sin embargo, en las cepas haploides esta aproximación no es válida, ya que la lisis celular tiene lugar antes de que las células inicien una nueva división nuclear.

Para dilucidar si el núcleo de las células haploides ha comenzado una nueva fase S, o por el contrario, no ha superado el punto de parada del ciclo nuclear descrito al final de la mitosis, se realizaron estudios de citometría de flujo en los que se pretendió valorar la cantidad de material génico que poseen las células de las cepas mutantes en el gen *CDC15*, tras ser incubadas a temperatura restrictiva. Para ello se tiñó el material génico con yoduro de propidio, previa eliminación del RNA por tratamiento con RNasa.

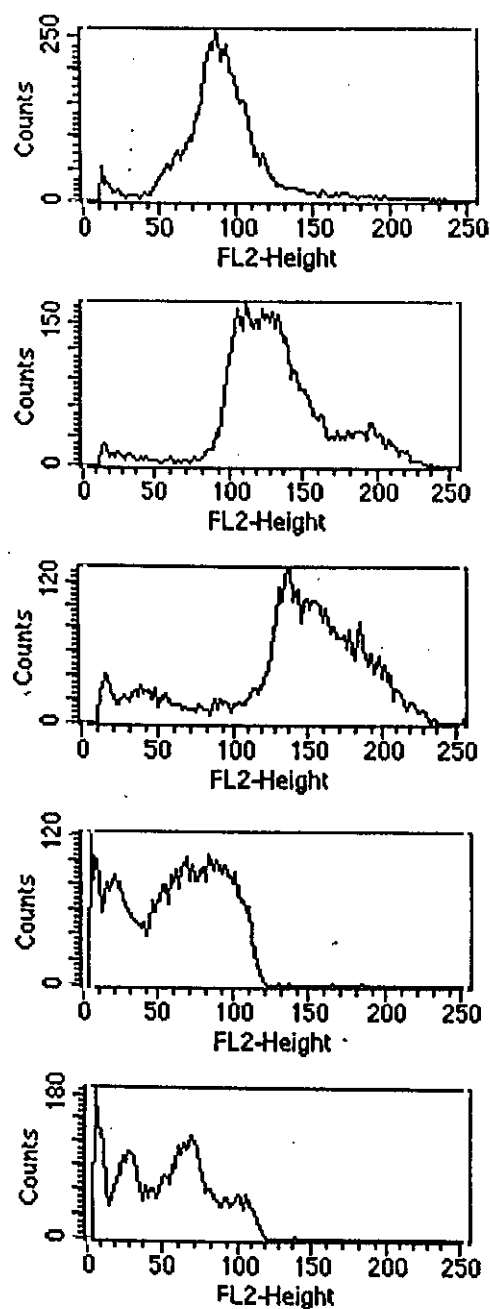
Se crecieron las células en un matraz de YPD durante 16 horas a 24°C, tras lo cual se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos. Las células se permeabilizaron por tratamiento con etanol al 70%. El RNA se eliminó por incubación en presencia de RNasa. Se tiñeron las células con yoduro de propidio y se analizó, mediante citometría de flujo, la fluorescencia que produce este compuesto al interaccionar con el DNA. Los resultados aparecen en la figura 25. En las gráficas mostradas se observa cómo cuando la cepa mutante crece a 24°C (tiempo 0) aparecen dos picos correspondientes a las poblaciones de células en fase G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. A las 2.5 horas de incubación a 37°C, se comienza a observar varios efectos que se van acentuando según avanza el tiempo de incubación a 37°C:

- Primero, de acuerdo a lo esperado para un mutante que detiene su ciclo celular al final de la mitosis, el pico de fluorescencia característico de las células en la fase G<sub>1</sub> comienza a disminuir hasta casi desaparecer.
- Segundo, aparece una población de células con un contenido de DNA superior al de las células paradas en G<sub>2</sub>, que puede ser debido a la pequeña proporción de células que han sido capaces de replicar el DNA antes de lisis, presentando varias células unidas, cada una con su núcleo, fenómeno ya mostrado en la tabla 10.
- Tercero, el pico de fluorescencia característico de la población de células en la fase G<sub>2</sub> sufre un desplazamiento progresivo hacia zonas de mayor intensidad de fluorescencia, lo que indica que las células poseen una cantidad de DNA superior a las células paradas en G<sub>2</sub>/M. Este resultado indica que el núcleo podría haber comenzado una nueva fase de síntesis de DNA o fase S, y por tanto, indica que las células habrían superado el punto de parada del ciclo celular del final de la mitosis.

También se sometió a este ensayo a la cepa diploide MY1, los resultados obtenidos son similares a los conseguidos con las cepas haploides y aparecen representados en la figura 26. En ella se pone de manifiesto la aparición de poblaciones de estructuras celulares que poseen una cantidad de DNA muy superior a la de las células en fase G<sub>2</sub> y, por tanto, la fluorescencia de estas células aparece desplazada hacia zonas de mayor intensidad. Estos resultados son congruentes con los mostrados en la figura 24, donde se observa como las cepas diploides dan lugar a células encadenadas sin septar, conteniendo un núcleo cada una de ellas.



**Figura 25:** Tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo del contenido de DNA. Serie izquierda cepa L2C24d (*cdc15-tyt1*). Serie derecha cepa RH210 (*cdc15-1*). Los tiempos de incubación a temperatura restrictiva, en ambos casos, fueron: 0, 1.5, 2.5, 3.5 y 5 horas (de arriba hacia abajo).



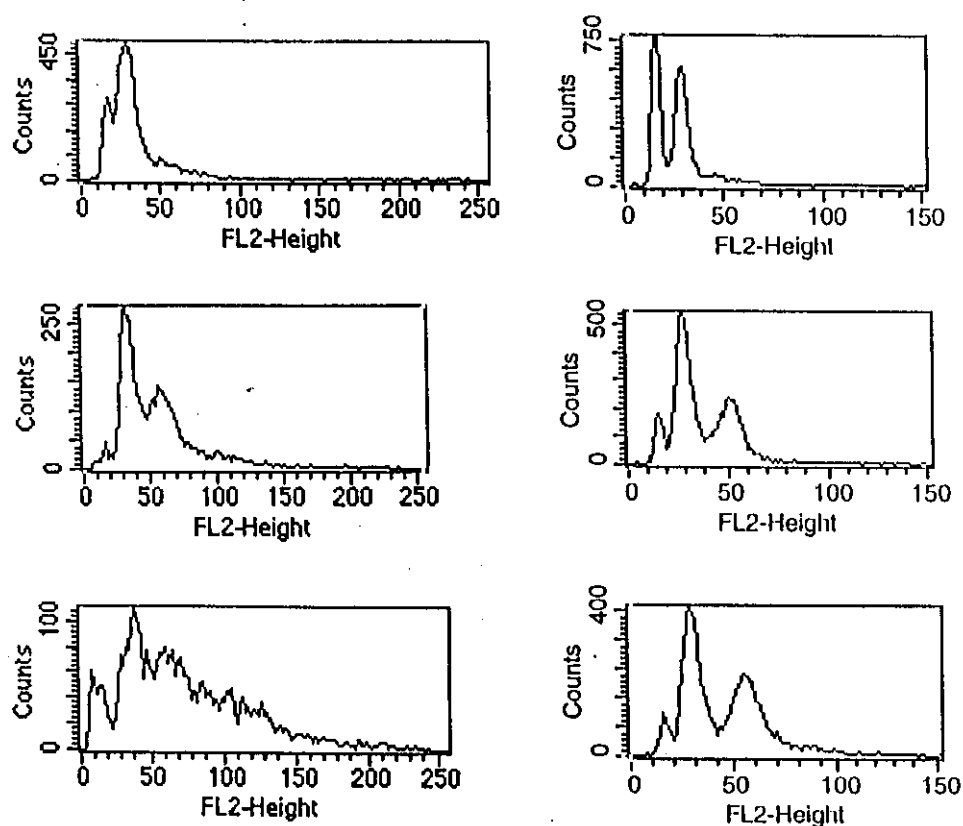
**Figura 26:** Tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo del contenido de DNA de la cepa mutante diploide MY1 tras 0, 1.5, 2.5, 3.5 y 5 horas de incubación a 37°C. Los tiempos aumentan de arriba hacia abajo.  
(\*) Valores de FL2 divididos a la mitad.

### **2.9.1. Ensayos de citometría en medio estabilizado con sorbitol 1 M.**

La estabilización osmótica del medio con sorbitol 1 M permite a las cepas mutantes en el gen *CDC15* retrasar ligeramente el proceso lítico (ver apartado 2.4. del presente capítulo), lo que determina que los ciclos celulares dispongan de más tiempo para progresar antes de que ocurra el fenómeno lítico.

Este fenómeno, en los ensayos de citometría, debería permitir la observación del ciclo nuclear con mayor claridad. Se crecieron las cepas a 24°C durante 16 horas en YPD conteniendo sorbitol a una concentración 1 M, se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos y se trataron del mismo modo que en ocasiones anteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27, donde se observa la paulatina aparición de una población de células que exhibe una intensidad de fluorescencia elevada, de forma similar, pero más acentuada, a la que se encuentra cuando no se estabiliza osmóticamente el medio.

Gráficas con el desarrollo mostrado en las figuras 25, 26 y 27 se pueden explicar por la aparición de estructuras celulares con más de dos núcleos.



**figura 27:** Tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo del contenido de DNA de las cepas L2C24d (Izquierda) y RH 210 (Derecha) creciendo en un medio estabilizado osmoticamente con sorbitol 1M. Los tiempos de incubación a temperatura restrictiva fueron: 0, 3, 5 y 5 horas (de arriba hacia abajo).

## 2.10. ¿EL FENOTIPO *lyt1* ES DEPENDIENTE DE ALELO?

Como se muestra en los apartados anteriores (tabla 10), la expresión fenotípica del defecto en el gen *CDC15* es diferente dependiendo de la cepa que se utilice. Así, la cepa RH210 (*cdc15-1*), cuando se incubaba a 37°C, detiene su ciclo celular con la célula hija de un tamaño comparable al de la célula madre, pero no desarrolla las estructuras apicales ni manifiesta la lisis celular, típicas de la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*).

Nos planteamos determinar si la formación de las estructuras apicales que desencadenan la lisis celular en la cepa L2C24d es específica de la mutación *lyt1* o si, por el contrario, se debe a un efecto del fondo genético. Para discernirlo se cruzó la cepa RH210 con la cepa silvestre 1784, el posterior estudio de los segregantes haploides que portaban el alelo *cdc15-1* mostró un fenotipo con aberraciones apicales y un elevado porcentaje de lisis celular en todos ellos, lo cual indica que la expresión del fenotipo que hemos descrito es independiente del alelo mutante.

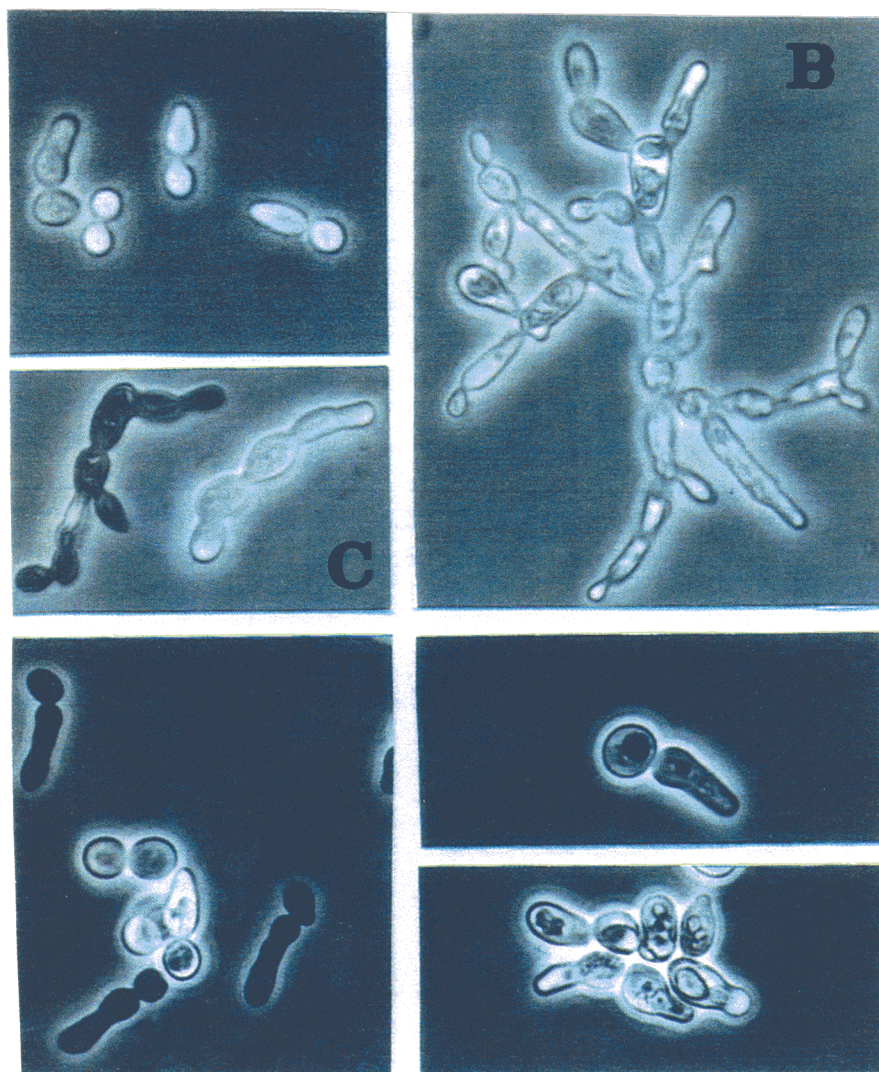
En un intento por determinar si el carácter lítico y morfológicamente aberrante depende de algún factor determinado y sencillo del fondo genético, se cruzó la cepa RH210 (*cdc15-1*) con la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*), el estudio de los segregantes mostró que todos ellos eran capaces de desarrollar la morfología aberrante y sufrir el proceso lítico. Este resultado indica que el fenotipo lítico no depende de un único factor del fondo genético que pueda ser genéticamente analizable de forma sencilla.

## 2.11. OTROS MUTANTES QUE MANIFIESTAN CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS SIMILARES.

Existen bastantes genes relacionados con el gen *CDC15*, con función necesaria para las células al final de la mitosis y cuya mutación confiere a las células un fenotipo similar al de los mutantes en el gen *CDC15*. Entre estos mutantes se han estudiado: (i) el mutante en el gen *DBF2*, que codifica una proteína quinasa (Johnston y col., 1990; Toyn y Johnston, 1994) que se supone implicada en la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p al final de la mitosis (Toyn y col., 1996), (ii) el mutante en el gen *CDC14*, que codifica una proteína fosfatasa (Wan y col., 1992) y (iii) el mutante en el gen *TEM1*, que codifica una proteína GTPasa de pequeño tamaño de la familia de las proteínas Ras (Shirayama y col., 1994b).

Las cepas mutantes en estos genes se crecieron a 24°C durante 16 horas en matraces con medio YPD, tras lo cual se diluyeron hasta densidad óptica 0.2 ( $\lambda=600$  nm), se incubaron durante 6 horas a 37°C y se observaron en el microscopio de contraste de fases. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28. En todas las células se observa la pérdida del patrón de polaridad axial, así como el crecimiento anormalmente alargado de la yema emergente, lo que determina la lisis celular. Todos estos rasgos fenotípicos son característicos de los mutantes en el gen *CDC15*, como se describe a lo largo del presente capítulo de resultados.





**Figura 28:** Imágenes de microscopía de contraste de fases de las cepas: L2C24d (*cde15-lyt1*) (A); VCY1 (*cde10-11*) (B); VCY242d (*cde10-11 cde15-1*) (C); L119-7c (*dbf2*) (D); RH1779 (*cde14*) (E) y EO156 (*tem1-3*) (F), tras ser incubadas durante 6 horas a temperatura restrictiva.



### 3. DESARROLLO DEL CICLO CELULAR EN MUTANTES EN EL GEN *CDC15* Y OTROS FUNCIONALMENTE RELACIONADOS.

En el apartado segundo del capítulo de resultados se documenta cómo los mutantes en el gen *CDC15* son capaces de superar el punto de parada del ciclo celular para ellos descrito. Resulta fácil deducir que, tanto en las cepas haploides como diploides de los mutantes en el gen *CDC15*, el ciclo celular continúa más allá de la parada al final de la mitosis y aborda una nueva fase S. Este dato, además, está avalado por el hecho de que el ciclo nuclear de estos mutantes progresa de forma paralela al ciclo morfogenético, es decir, no existe descoordinación entre ellos (ver apartado 2.8. y 2.9. del presente capítulo).

Partiendo de estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo fue la siguiente: los mutantes en el gen *CDC15*, a temperatura restrictiva, presentan deficiencias al final de la mitosis que les impiden iniciar el proceso de septación y citoquinesis. Las disfunciones en el inicio del proceso de septación podrían ser las responsables de la activación de un mecanismo de control del ciclo celular, que obligaría a detener la progresión del ciclo al final de la anafase. El objeto de la detención del ciclo sería proporcionar tiempo a la célula para subsanar las anomalías conferidas por la mutación. La superación del supuesto punto de control sin solucionar los problemas en la septación, ocasionados por la mutación, tendría como consecuencia la pérdida del patrón de polaridad y la lisis celular descrita en el presente trabajo.

Esta hipótesis de trabajo implica la existencia de un mecanismo de control del ciclo celular o "*checkpoint*" que se activaría como respuesta a la deficiencia en algún proceso celular mediado por el gen *CDC15* al final de la mitosis.

La existencia de un *checkpoint* en un determinado momento del ciclo celular se pone de manifiesto por una parada del ciclo en ese punto. La parada puede ser definitiva o momentánea, lo que redundaría en un ciclo celular más largo que el de las células silvestres (Hartwell y Weinert, 1989; Lew y Reed, 1995; Carr, 1996; Elledge, 1996; Yang y col., 1997; Toczysky y col., 1997).

Para verificar nuestra hipótesis tenemos que demostrar que el ciclo celular de los mutantes en el gen *CDC15*, a temperatura restrictiva, se encuentra retrasado debido a la parada en la anafase mitótica. La aproximación experimental que se eligió consiste en medir el tiempo que transcurre desde que una célula (célula madre) aborda su primera gemación (que se convertirá en la célula hija) hasta que la célula hija inicia una nueva gemación; la cual es anormalmente apical, como se describe en el apartado segundo del presente capítulo de resultados. El valor de tiempo obtenido se comparará con el tiempo invertido en el mismo proceso por la célula hija de una cepa control apropiada. Dicha aproximación se detalla en la figura 29.

Para llevar a cabo el ensayo de progresión del ciclo celular o "*timing*" descrito anteriormente, se crecieron las cepas objeto de estudio y sus cepas control, en idénticas condiciones, durante 16 horas a 24°C. Las células se colocaron sobre una lámina de YPD de 1 mm de espesor, que se situó entre un porta y un cubreobjetos. La observación se realizó en un microscopio de contraste de fases dotado con una pletina termostatzada, que mantiene las células a la temperatura deseada. Para más detalle ver el capítulo de materiales y métodos.

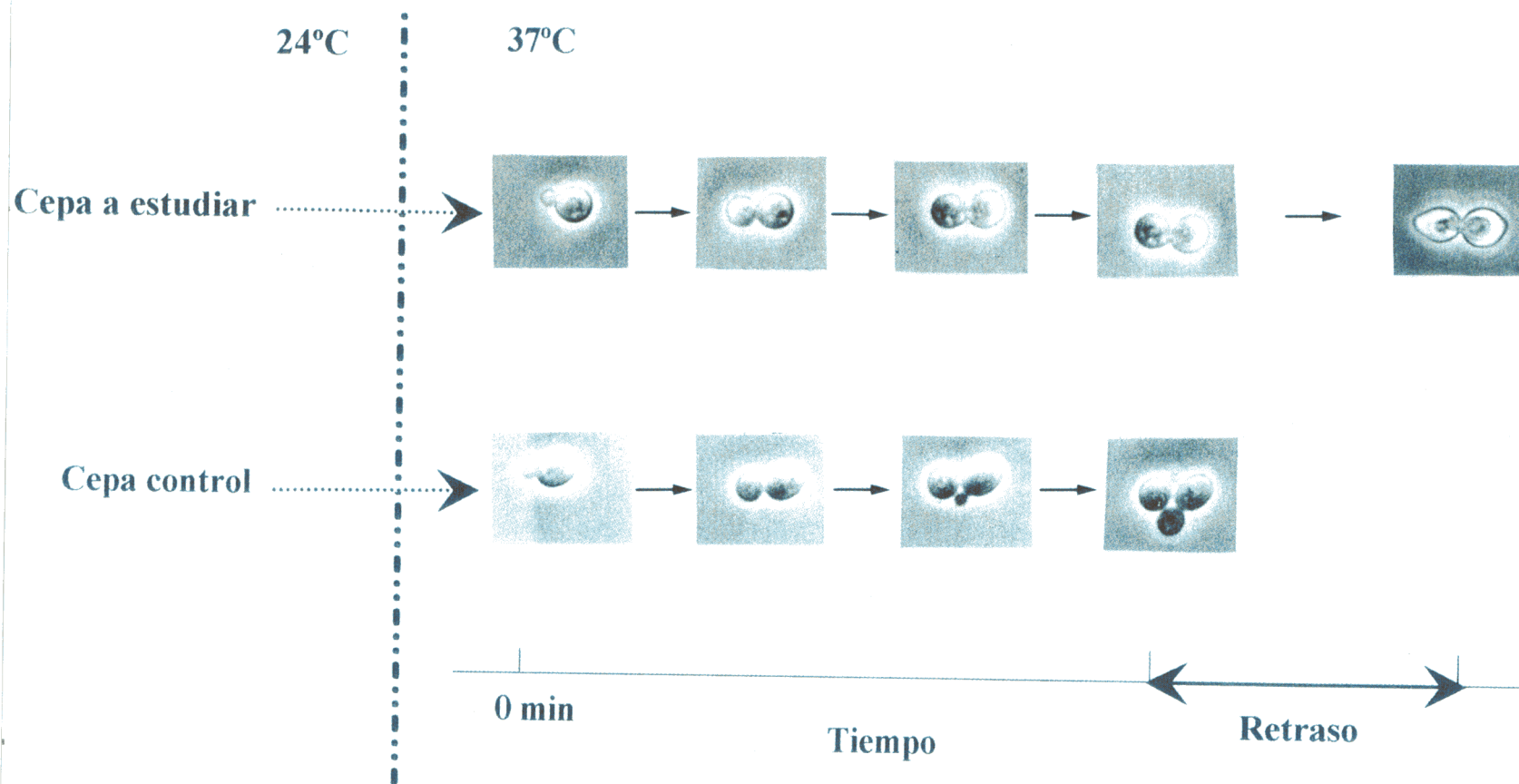


Figura 29: Esquema de la realización de las medidas del tiempo de gemación o ensayos de "timing".

### 3.1 ENSAYOS DE "TIMING".

#### 3.1.1. Ensayos de *timing* con la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*).

Se creció la cepa mutante L2C24d, durante 16 horas a 24°C, en una placa de medio mínimo suplementada con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarias para su crecimiento. Las células se inocularon en una laminilla de YPD y se dispusieron sobre la pletina termostatzada, previamente calentada hasta 39.5°C, (ensayos previos indican que es ésta la temperatura óptima para la expresión del fenotipo en estas condiciones de ensayo). Como cepa control se empleó la misma cepa L2C24d transformada con el plásmido centromérico pBS9 que porta el gen *CDC15* y que se comporta como una cepa silvestre a temperatura restrictiva. La cepa control se creció del mismo modo que la cepa mutante, en una placa de medio mínimo suplementada con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarias excepto uracilo, ya que éste es el marcador auxotrófico del plásmido.

El tiempo de gemación se midió en diferentes células y en distintos ensayos con el fin de minimizar el error. Como se detalla en la tabla 13, se encontró un retraso de alrededor de 45 minutos en la gemación de las células de la cepa mutante respecto de las células de la cepa transformada con el plásmido que porta el gen silvestre.

**Tabla 13:**

Cepa	Tiempo de gemación a 37°C	Tiempo de gemación del control a 37°C	Retraso
L2C24d ( <i>cdc15-lyt1</i> )	130.8 min (32 cels.)	85.7 min (25 cels.)	45 min.
EO156 ( <i>tem1-3</i> )	116.3 min (23 cels.)	91.4 min (10 cels.)	25 min.
VCY1 ( <i>cdc10-11</i> )	91.1 min (22 cels.)	83.2 min (11 cels.)	8 min.
VCY242d ( <i>cdc10-11 cdc15-1</i> )	83.7 min (25 cels.)	77.4 min (26 cels.)	6 min.
VCY242d + <i>CDC15</i>	81.1 min (27 cels.)	83.7 min (25 cels.)	-----
VCY242d + <i>CDC10</i>	119.2 min (40 cels.)	83.7 min (25 cels.)	36 min.

Es necesario un nuevo control para asegurar que la responsable del retraso es la mutación en el gen *CDC15*, que porta la cepa L2C24d, y descartar que la expresión del gen silvestre desde el plásmido pBS9, con el que se construyó la cepa control, pudiera interferir en el ciclo celular y posibilitar a la cepa transformada progresar más rápidamente en el ciclo. Para

realizar este control, se repitió el experimento en idénticas condiciones, pero a la temperatura permisiva de 28°C. El resultado recogido indica que la cepa control es válida para los ensayos de *timing*, ya que no se observa retraso alguno en el ciclo celular de ninguna de las dos cepas a temperatura permisiva (tabla 14).

**Tabla 14:**

Cepa	Tiempo de gemación a 28°C	Tiempo de gemación del control a 28°C	Retraso
L2C24d ( <i>cdc15-lyt1</i> )	98.9 min (24 cels.)	97.6 min (25 cels.)	1 min.
EO156 ( <i>tem1-3</i> )	96.3 min (21 cels.)	97.4 min (18 cels.)	---- min.
VCY1 ( <i>cdc10-11</i> )	103,9 min (20 cels.)	102.5 min (24 cels.)	1 min.
VCY242d ( <i>cdc10-11 cdc15-1</i> )	95.6 min (16 cels.)	95.2 min (20 cels.)	0 min.
VCY242d + <i>CDC15</i>	94.5 min (14 cels.)	95.6 min (16 cels.)	---- min.
VCY242d + <i>CDC10</i>	94.6 min (14 cels.)	95.6 min (16 cels.)	---- min.

### 3.1.2. Ensayos de *timing* en un mutante en el gen *TEM1*.

Disponemos de la cepa mutante EO156 (*tem1-3*) y su isogénica silvestre RAY-3a, cedidas amablemente por el Dr. Akio Toh-e de la Universidad de Tokio.

El gen *TEM1* se encuentra relacionado funcionalmente con el gen *CDC15*. Así lo indican los resultados de complementación en multicopia del gen *CDC15* sobre la cepa mutante EO156 (Shirayama y col., 1994b). También hay que tener en cuenta que el fenotipo terminal de la cepa mutante EO156 es indistinguible del fenotipo de las cepas mutantes en el gen *CDC15*, como se muestra en la figura 28.

Con estos antecedentes se decidió llevar a cabo los estudios de *timing* de la cepa EO156, empleándose como control la cepa isogénica silvestre RAY-3a. El ensayo se realizó en las condiciones estandarizadas y descritas anteriormente.

El resultado se muestra en la tabla 13. Se observa un retraso de alrededor de 25 minutos de la cepa mutante respecto de la cepa isogénica silvestre, lo que supone un 30% de aumento del tiempo empleado en la consecución del ciclo celular, a temperatura restrictiva, por parte de la cepa mutante en el gen *TEM1* respecto de su cepa isogénica silvestre. Este resultado es similar al que se encontró en la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*), lo que parece indicar que el retraso

del ciclo no es un efecto atribuible exclusivamente al defecto en el gen *CDC15*, sino que podría deberse a un mecanismo celular encargado de dar cuenta de la correcta consecución de las últimas fases de la mitosis, independientemente del gen afectado.

### 3.1.3. Ensayos de *timing* en un mutante en el gen *CDC10*.

El gen *CDC10* pertenece a un grupo de genes que codifican unas proteínas estructurales llamadas septinas, las cuales se localizan en la constricción entre la célula madre y la yema a lo largo de todo el proceso de gemación (Hartwell, 1971a; Flescher y col., 1993). Los mutantes en el gen *CDC10* son incapaces de llevar a cabo, de forma correcta, el proceso de septación. A diferencia de los mutantes en el gen *CDC15*, éstos son capaces de iniciar el proceso de septación, pero no localizan el septo de forma correcta y éste presenta un desarrollo anómalo. Manifiestan una morfología con yemas en forma tubular, determinada por la hiperpolarización apical del citoesqueleto de actina (Cid, 1996).

El papel que desempeña Cdc10p en el proceso de septación nos indujo a realizar ensayos de *timing*, con el ánimo de determinar si la deficiencia en el proceso de septación es la responsable de activar el mecanismo de control que detiene el ciclo celular y por tanto determina el retraso observado en las cepas defectivas en los genes *CDC15* y *TEM1*.

Disponemos de la cepa VCY1, que porta la mutación *cdc10-11*, y la cepa 1783, isogénica silvestre de la anterior (Cid, 1996).

Los ensayos de *timing* se realizaron en las condiciones estandarizadas y descritas anteriormente. Los resultados se detallan en la tabla 13. Contrariamente a lo esperado, los tiempos de gemación que se encontraron en las células de la cepa mutante, respecto de su isogénica silvestre, son muy similares. Los escasos 8 minutos de diferencia observados, podrían ser consecuencia del desarrollo anormal de las yemas en la cepa mutante, las cuales, ya desde su emergencia, presentan una morfología alargada y tubular anormal. El desarrollo, a temperatura permisiva, tampoco reveló diferencia alguna entre las dos cepas, como se detalla en la tabla 14.

Este resultado, nos sugirió dos posibles explicaciones:

- Primero, el defecto en el proceso de septación no es el responsable de activar el mecanismo de control celular, lo que indicaría que éste sería disparado por algún proceso previo en el que se hallarían implicadas las proteínas Cdc15p y Tem1p.

- Segundo, la septina Cdc10p (o la estructura de proteínas de la que forma parte) se encuentra directamente implicada en la maquinaria señalizadora del mecanismo de control celular, así, una defectuosa estructura en el anillo de septinas anularía el mecanismo de control celular.

Para discernir entre las dos hipótesis, se decidió estudiar el *timing* de una cepa doble mutante en los genes *CDC10* y *CDC15*. Como controles se utilizaron: la cepa doble mutante transformada con el gen silvestre *CDC10* en el plásmido centromérico YEp111, la cepa doble mutante transformada con el gen silvestre *CDC15* en el plásmido centromérico pBS9 y la cepa doble mutante transformada con ambos plásmidos.

### 3.1.4. Ensayos de *timing* en el doble mutante *cdc10 cdc15*.

Disponemos de la cepa VCY242d, doble mutante *cdc10-11 cdc15-1*, obtenida por el cruce y posterior esporulación y micromanipulación de las cepas VCY1 (*cdc10-11*) y RH210 (*cdc15-1*) (Cid, 1996).

Los resultados obtenidos en los ensayos de *timing* con la cepa VCY242d aparecen en la tabla 13, donde se muestra cómo la cepa doble mutante VCY242d transformada con el gen *CDC10*, es decir, defectuosa en el gen *CDC15*, presenta un retraso de 36 minutos respecto de la cepa control (cepa doble mutante transformada con los dos plásmidos); resultado similar al obtenido previamente con la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*).

Cuando se realizó el ensayo de *timing* con la cepa doble mutante VCY242d transformada con el gen *CDC15*, es decir, defectuosa en el gen *CDC10*, se encontró un valor de tiempo de gemación idéntico al de la cepa control (cepa doble mutante transformada con los dos plásmidos); resultado análogo al obtenido con la cepa VCY1 (*cdc10-11*).

El tiempo de gemación de la cepa doble mutante *cdc10 cdc15* es idéntico al de la misma cepa transformada con los dos genes silvestres. Es decir, un mutante *cdc15*, en un fondo mutante *cdc10*, no presenta retraso en el proceso de gemación. O lo que es lo mismo, los mutantes en el gen *CDC10* no tendrían del mecanismo de control del ciclo celular objeto de estudio. Este resultado apoya la segunda de las hipótesis planteadas en el apartado anterior, según la cual, la estructura de septinas, en la que se encuentra integrada la proteína Cdc10p, formaría parte del sistema de señalización encargado de comprobar que se han llevado a cabo correctamente todos los procesos del ciclo celular en el final de la mitosis.

Como en los ensayos anteriores, se analizó el tiempo de gemación a temperatura permisiva de la cepa doble mutante VCY242d, así como de las cepas transformadas con cada uno de los plásmidos portadores de los genes silvestres y la cepa transformada con los dos. Los resultados se muestran en la tabla 14. En todas ellas el tiempo de gemación es comparable, lo que indica que las diferencias observadas no son un artefacto debido a la presencia de los distintos plásmidos.

### 3.1.5. Ensayos de *timing* con la cepa diploide MY1 (*cdc15-lyt1/cdc15-1*).

En todas las cepas estudiadas se ha observado un retraso en la gemación de la célula hija, mientras que la célula madre pierde la capacidad de gemar. Sin embargo, como se muestra en la figura 16, en las cepas diploides la célula madre sí es capaz de comenzar una nueva ronda de gemación, aunque inicia el proceso proliferativo posteriormente a la gemación de la célula hija, lo que ya supone un retraso en el ciclo celular de la célula madre respecto del ciclo celular de la célula hija.

La cepa elegida para este ensayo fue la MY1, debido a que es la cepa diploide que muestra el fenotipo con mayor intensidad. No obstante, la cepa MY1 presenta un inconveniente derivado de poseer los alelos *ura3-52/URA3* y *ura1/URA1*. Este rasgo genotípico nos imposibilitó transformarla con el vector pBS9, que porta el gen *CDC15* silvestre. Así pues, para lograr la cepa control, se transformó la cepa haploide L2C24d con el

plásmido pBS9 y un transformante así logrado se cruzó con la cepa RH210. De este modo, se consiguió una nueva cepa diploide, idéntica a la MY1, pero que porta el plásmido con el gen *CDC15* y que, por tanto, se comporta como una cepa silvestre a temperatura restrictiva.

Los resultados obtenidos en los ensayos de *timing* con la cepa MY1 se muestran en la tabla 15. En ella se ilustra el anómalo retraso que sufre la célula madre en su nueva gemación respecto de la célula hija, así como el retraso que ambas células, madre e hija, presentan respecto de las células madre e hija de la cepa control. Nos llama la atención la notoria disminución del retraso en la gemación que manifiesta la célula hija de la cepa diploide respecto al retraso que muestra la célula hija de las cepas haploides (17 minutos la célula hija de la cepa diploide frente a 45 minutos la célula hija de la cepa haploide).

**Tabla 15:**

	<b>Tiempo cepa MY1 (37°C)</b>	<b>Tiempo cepa control (37°C)</b>	<b>Retraso</b>
<b>Célula madre</b>	100.4 min. (38 cels.)	63.1 min. (18 cels.)	<b>37 min.</b>
<b>Célula hija</b>	84.4 min. (38 cels.)	67.6 min. (18 cels.)	<b>17 min.</b>

Como en los casos anteriores, se llevó a cabo de forma paralela un control de las cepas, realizándose los ensayos de *timing* a temperatura permisiva. De este modo, se pretendió asegurar que las diferencias observadas no son debidas a la diferente expresión del gen *CDC15* desde el plásmido pBS9 (tabla 16).

**Tabla 16:**

	<b>Tiempo cepa MY1 (28°C)</b>	<b>Tiempo cepa control (28°C)</b>	<b>Retraso</b>
<b>Célula madre</b>	85.6 min. (18 cels.)	84.9 min. (18 cels.)	<b>0.7 min.</b>
<b>Célula hija</b>	99.3 min. (18 cels.)	98.3 min. (18 cels.)	<b>1 min.</b>

### **3.2. EXPRESIÓN DEL FENOTIPO DE LOS MUTANTES EN EL GEN *CDC15*.**

Los resultados obtenidos indican que el producto del gen *CDC15* se encuentra involucrado en el inicio del proceso de septación, cuyo defecto origina la parada del ciclo celular en la anafase mitótica. También hemos observado que las células pertenecientes a estas cepas mutantes son capaces de superar la parada descrita del ciclo celular, abordando una nueva fase S sin haber subsanado los problemas de septación del ciclo celular anterior, lo que determina las disfunciones morfogenéticas y de polaridad que exhiben los mutantes en el gen *CDC15* a temperatura restrictiva.

Observaciones previas nos advirtieron sobre la heterogénea expresión del fenotipo, en lo referente a la superación de la parada del ciclo celular. Este fenómeno ocurre no sólo en las distintas cepas, sino también en los diferentes experimentos realizados en cada cepa. Por ello, se decidió llevar a cabo estudios para determinar la relación entre las condiciones del cultivo y la expresión del fenotipo.

La importancia de estos estudios se centra en la dependencia que existe entre la proporción de células que supera la parada del ciclo celular con algunos factores que se desconocen. Con estos ensayos se pretende clarificar e identificar los factores que determinan la variabilidad fenotípica y, en definitiva, aportar información sobre la naturaleza de la parada del ciclo celular ya que, no hay que olvidar, que son las células que superan la parada del ciclo celular las que muestran el desarrollo anormal, en cuanto a su polaridad y morfogénesis se refiere.

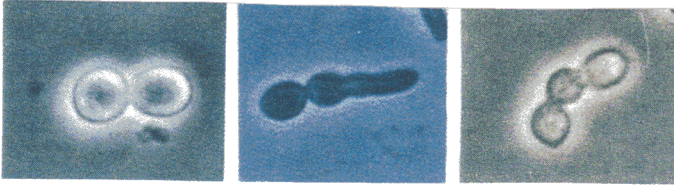
#### **3.2.1. Influencia de la adición de medio de cultivo fresco en el momento de comenzar la incubación a 37°C.**

Observaciones en el laboratorio nos alertaron sobre la diferente expresión fenotípica de la mutación cuando, después de crecer un cultivo de una cepa mutante en el gen *CDC15* a 24°C y previamente a la incubación a temperatura restrictiva, se renueva el cultivo añadiendo YPD fresco al medio de cultivo anterior.

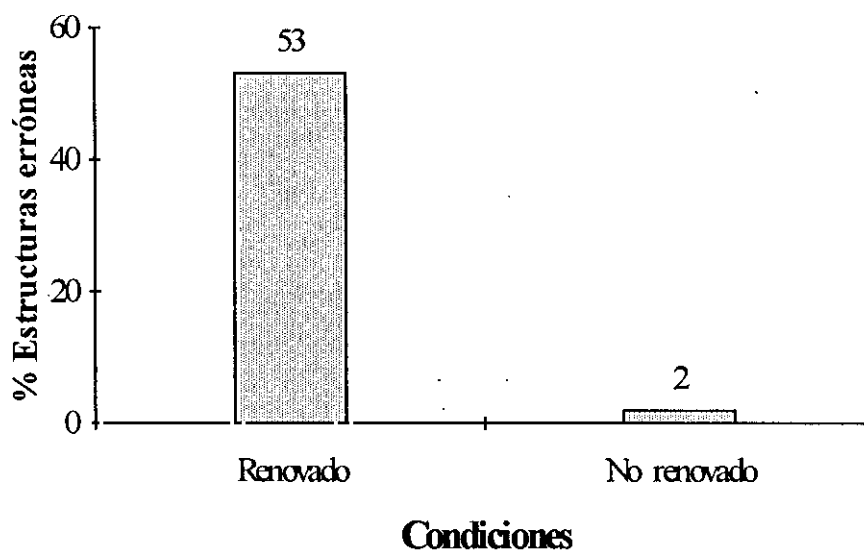
Para documentar esta observación se decidieron realizar el siguiente ensayo: se crecieron las células en un matraz con 100 ml de YPD durante 16 horas a 24°C; se dividió el cultivo en dos matraces, a uno de los cuales se añadió 50 ml de YPD fresco, ambos matraces fueron incubados a 37°C durante 6 horas. Los resultados obtenidos sobre la expresión del fenotipo en estas condiciones se exponen en la tabla 17.



Tabla 17:

CEPA	Condiciones			
<b>L2C24d</b> ( <i>cdc15-lyt1</i> )	No renovado	23% (47 cels.)	73% (148 cels.)	4% (7 cels.)
<b>L2C24d</b>	Renovado	11% (20 cels.)	81% (142 cels.)	8% (13 cels.)
<b>RH210</b> ( <i>cdc15-1</i> )	No renovado	96% (258 cels.)	2% (5 cels.)	1% (3 cels.)
<b>RH210</b>	Renovado	23% (35 cels.)	66% (102 cels.)	11% (18 cels.)
<b>MY1</b> ( <i>cdc15-1/cdc15-lyt1</i> )	No renovado	29% (75 cels.)	43% (110 cels.)	28% (70 cels.)
<b>MY1</b>	Renovado	3% (8 cels.)	48% (106 cels.)	49% (108cels)
<b>DU3</b> ( <i>cdc15-lyt1/cdc15-lyt1</i> )	No renovado	36% (81 cels.)	40% (88 cels.)	24% (54 cels.)
<b>DU3</b>	Renovado	23% (39 cels.)	54% (92 cels.)	23% (40 cels.)

Para profundizar más en el fenómeno anteriormente descrito se creció un nuevo cultivo de la cepa RH210 durante 16 horas a 24°C, tras lo cual se incubó durante 4 horas a 37°C; nos cercioramos de que las células se encontraban detenidas en el punto de parada descrito para este mutante (con la yema del tamaño de la célula madre, pero sin desarrollar las estructuras aberrantes características del soslayo de la parada del ciclo celular). En este momento se renovó la mitad del cultivo con medio de cultivo fresco y atemperado, la otra mitad se empleó como control sin renovar. Se incubaron ambos cultivos durante 6 horas a 37°C, los resultados de la expresión fenotípica se muestran en la figura 30.

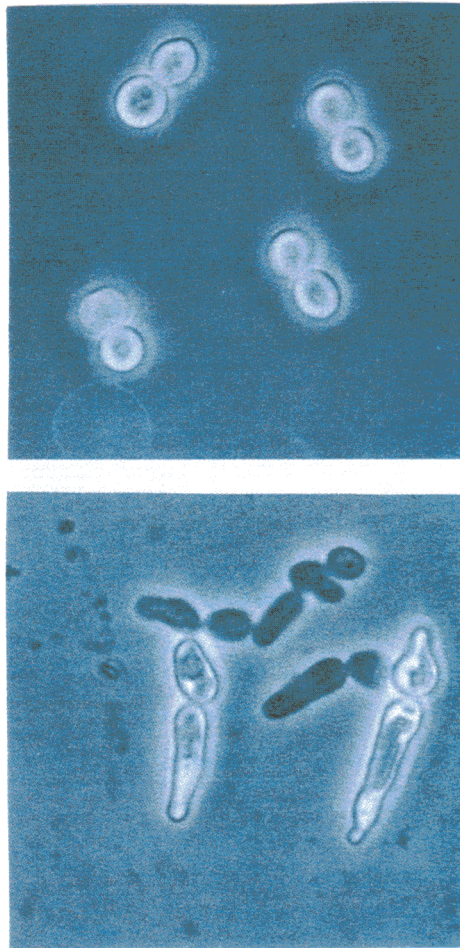


**Figura 30:** Influencia en la expresión fenotípica de la adición de medio de cultivo fresco cuando las células ya se hallan detenidas al final de la mitosis. Cepa RH210.

Al igual que ocurre cuando se estabiliza el medio con sorbitol 1 M (ver apartado 2.4. del capítulo de resultados), el efecto de la adición de medio fresco sobre el fenotipo no es sólo cuantitativo, sino que el fenotipo de las estructuras aberrantes sufre un agudizamiento. Fotografías de contraste de fases en las que se ilustra este resultado se muestran en la figura 31.

Este resultado abre diversas posibilidades sobre los fenómenos que pueden causar el efecto fenotípico observado al renovar el medio de cultivo:

- La variación en la concentración de glucosa u otros nutrientes al renovar el medio podría inducir el efecto observado.
- La variación de pH al renovar el medio podría ser la responsable del efecto.
- La existencia de algún compuesto capaz de inducir la diferente expresión fenotípica al renovar el cultivo.
- La existencia de algún compuesto capaz de inhibir la expresión del fenotipo, sustancia que se diluiría por debajo de su umbral de actuación al renovar el medio de cultivo.



**Figura 31:** Fotografías de contraste de fases de la cepa RH210 (*cde15-1*) “sin renovar” (Arriba) y “renovada” con un volumen de YPD fresco (Abajo). Seguidamente ambos cultivos se incubaron durante 6 horas a 37°C.

### 3.2.2. Influencia de la concentración de glucosa en el medio sobre la expresión del fenotipo.

Al renovar el medio de cultivo, previamente a la incubación a 37°C, ocurre un incremento en la concentración de nutrientes y en especial de la glucosa. Deseábamos analizar la posibilidad de que el aumento en la concentración de glucosa fuera el responsable de la variación en la expresión fenotípica.

Para determinar la influencia de la concentración de glucosa se preparó medio de cultivo YPD que contenía diferentes concentraciones de glucosa (2%, 1%, 0.5%, 0.2% y 0.1%).

Se creció la cepa RH210 (*cdc15-1*), elegida por ser la que presenta el efecto objeto de estudio con mayor intensidad, en YPD durante 16 horas a 24°C y seguidamente se renovó con YPD que contenía las diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados obtenidos tras una incubación de 6 horas a 37°C se muestran en la figura 32. La variación en la concentración de glucosa parece no ejercer efecto alguno, ni como fuente de carbono ni como osmolito, sobre la expresión fenotípica.

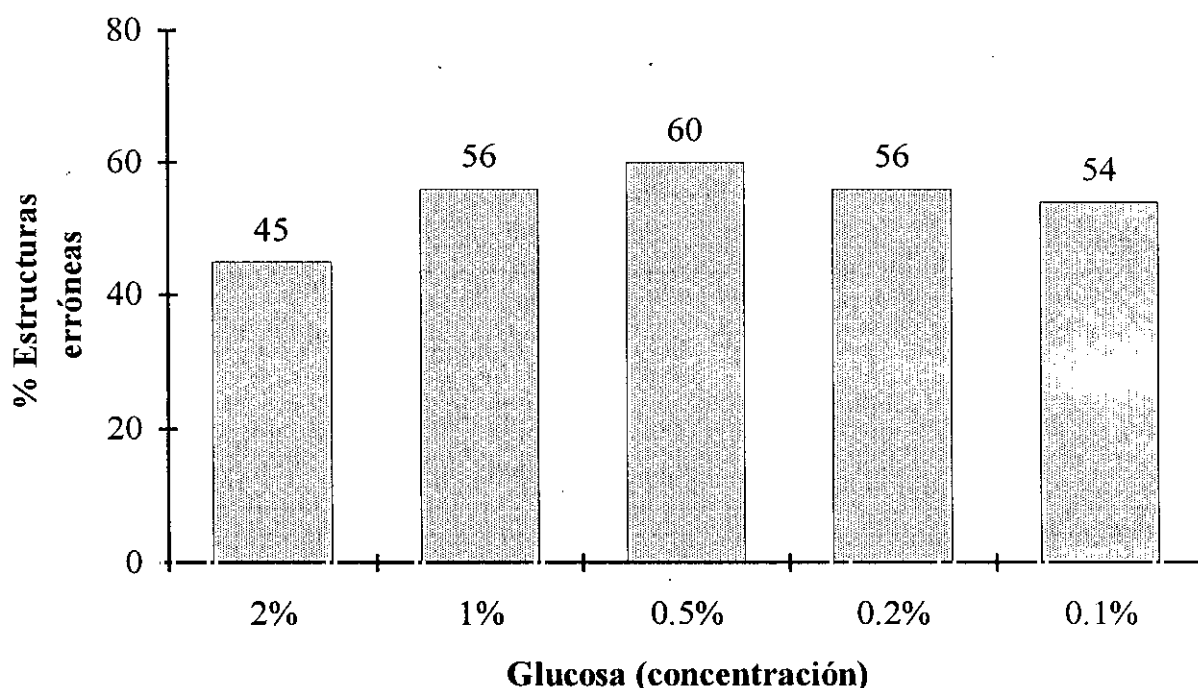


Figura 32: Influencia de la variación de la concentración de glucosa en la expresión fenotípica de la cepa RH210 cuando es refrescada previamente a la incubación a temperatura restrictiva.

De modo análogo se analizó la influencia de otros nutrientes, realizándose idénticos ensayos, añadiendo al medio de cultivo un complejo vitamínico y de cofactores (Nurse, 1975) sin obtener diferencias fenotípicas, lo cual nos indicó que no debía tratarse de un factor nutricional.

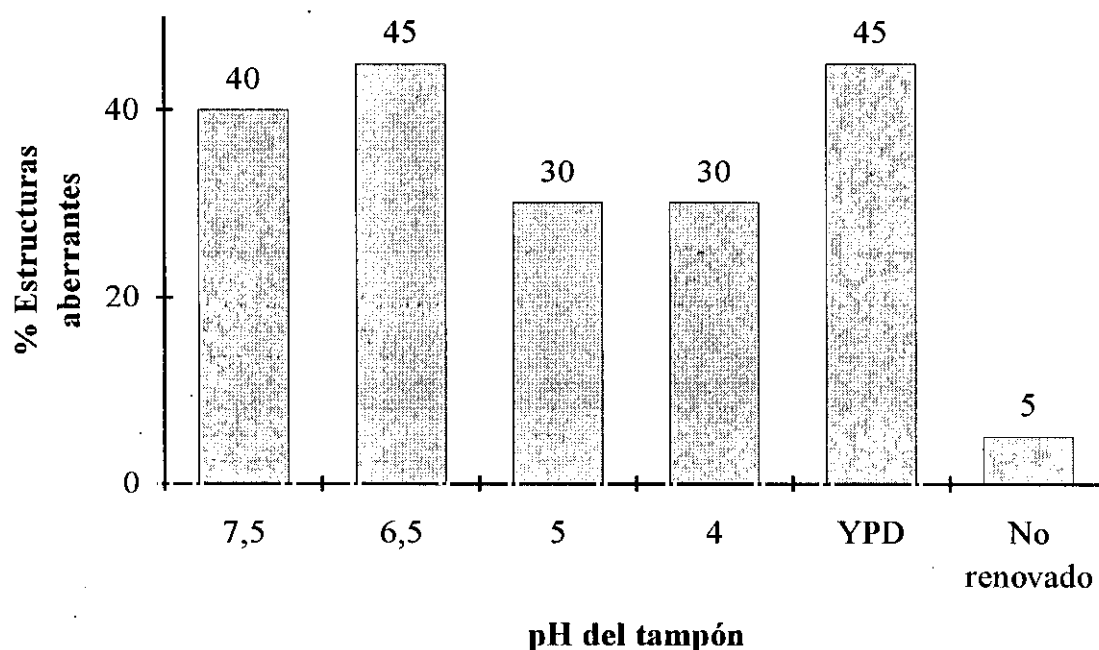
### 3.2.3. Influencia de la variación de pH al renovar el medio.

Se han descrito genes requeridos para fenómenos morfogenéticos que se encuentran regulados por variaciones de pH (Saporito-Irwin y col., 1995). Para verificar si nos encontramos ante un fenómeno similar, en el cual la ligera variación de pH que pudiera ocurrir al renovar el medio de cultivo con YPD fresco fuera la responsable de la diferente expresión fenotípica, se preparó YPD tamponado con tampón fosfato 0.1 M, ajustado a diferentes valores de pH. Se creció la cepa RH210 en YPD durante 16 horas a 24°C y seguidamente se renovó con YPD tamponado. Como controles se emplearon: un cultivo sin renovar y otro renovado en YPD sin tamponar. Además, se midió el pH de todos los cultivos antes y después de las 6 horas de incubación a 37°C, encontrando los valores detallados en la tabla 18.

**Tabla 18:**

pH del tampón	7.5	6.5	5	4	YPD	YPD sin renovar
pH inicial	7.0	6.4	5.8	5.3	6.6	6.6
pH final (6 h)	6.9	6.2	5.6	5.2	6.0	5.7

Con los valores de pH elegidos se cubrió el intervalo de variación pH que ocurre al renovar el medio con YPD fresco. En la figura 33 se detallan los resultados obtenidos, en ellos no se observa ninguna variación respecto a los resultados previamente mencionados; lo que excluye a la variación del pH de las diferencias en la expresión del fenotipo.



**Figura 33:** Influencia de la variación del pH en la expresión fenotípica, al renovar el medio de cultivo de la cepa RH210, previamente a la incubación a 37°C.

#### 3.2.4. Existencia de alguna sustancia inductora de la expresión del fenotipo.

Dada la naturaleza compleja del YPD, que contiene extracto de levadura y un hidrolizado proteico, nos dispusimos a analizar si en el YPD fresco existe algún compuesto capaz de inducir la expresión del fenotipo cuando se refresca el cultivo y que es eliminado con el crecimiento de las células a 24°C.

Para aclarar este punto, se renovó el cultivo de la cepa RH210 con YPD, en el que previamente, se creció un cultivo de la misma cepa a 24°C durante 16 horas y se filtró dos veces con el fin de eliminar todas las células. De este modo, se renovó un cultivo de la cepa RH210 tras ser crecido a 24°C, empleando un YPD ya usado y filtrado, carente, por tanto, de la supuesta sustancia inductora. Sin embargo los resultados que se obtuvieron no revelaron diferencia alguna entre renovar los cultivos con medio fresco o con medio usado, lo cual compromete la hipótesis de la existencia de una sustancia inductora del fenotipo en el YPD fresco.

En otra aproximación paralela, se repitieron los ensayos sustituyendo el YPD como medio de cultivo por medio mínimo (eliminando así la posible influencia de un medio tan complejo como el YPD) suplementado con todos los aminoácidos necesarios. El resultado es similar al obtenido con YPD, sin embargo, cabe señalar, que en medio mínimo la expresión fenotípica es menor que en YPD, como se observa en la figura 34.

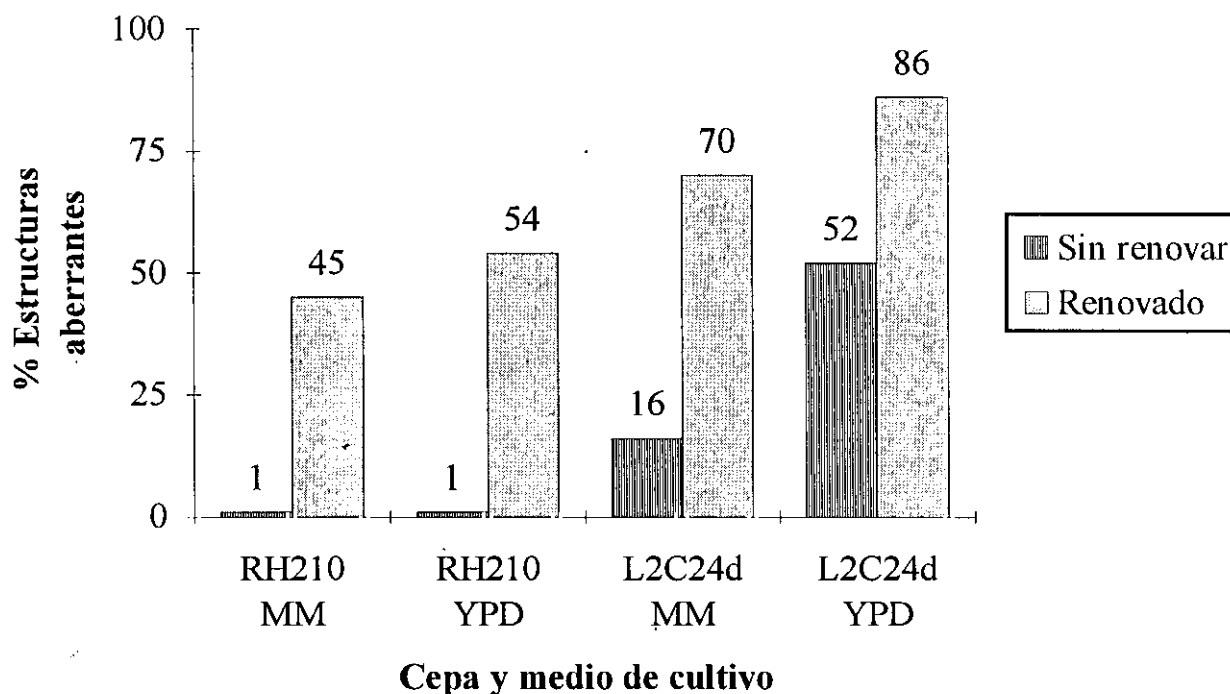


Figura 34: Influencia del medio de cultivo en la expresión del fenotipo.

### 3.2.5. Existencia de alguna sustancia inhibidora de la expresión del fenotipo.

Está descrito, sobre todo en organismos procarióticos y en hongos filamentosos, la existencia de sustancias o factores secretados por las células al medio de cultivo, destinados a modificar o dirigir los patrones de desarrollo morfogénicos.

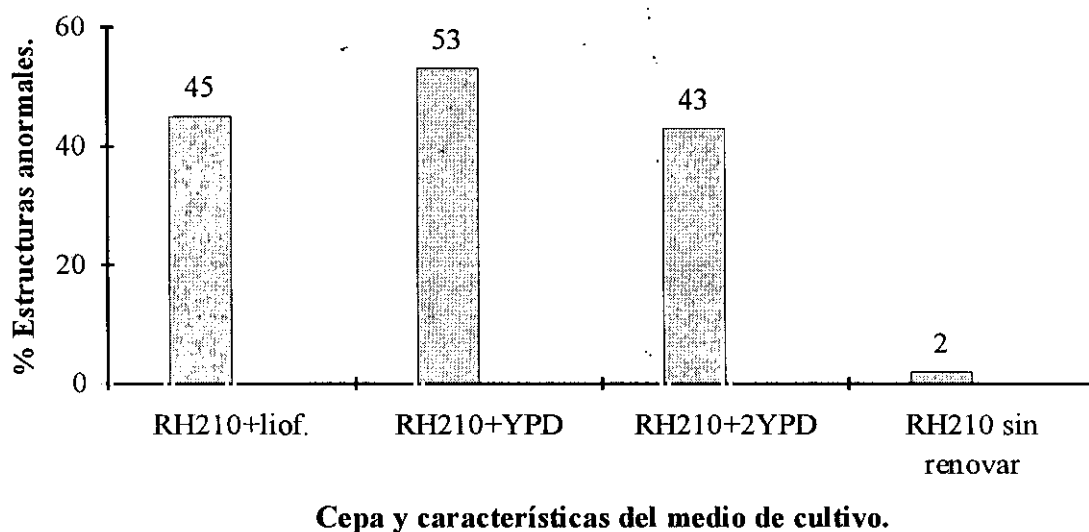
La secreción por parte de las células, cuando crecen a 24°C, de algún factor capaz de inhibir la nueva entrada en fase S sin haber terminado correctamente el anterior ciclo celular, podría ser una nueva explicación a la diferente expresión fenotípica obtenida al renovar el medio de cultivo. Esta nueva hipótesis de trabajo implica que dicha sustancia, para ser funcional, tendría que encontrarse a una concentración adecuada. Así pues, la dilución del supuesto factor inhibidor del ciclo al renovar el medio de cultivo con medio fresco, posibilitaría

que una mayor proporción de células continuaran con el ciclo celular, produciendo las aberraciones morfológicas descritas.

Para estudiar esta nueva hipótesis, se creció un cultivo de la cepa RH210 durante 16 horas a 24°C, se eliminaron las células por filtración, lográndose un medio de cultivo filtrado, que supuestamente contendría el factor inhibidor. El medio de cultivo así obtenido se liofilizó.

Se creció un nuevo cultivo de la cepa RH210 a 24°C, al cual, además de renovarse con YPD fresco, se le añadió una cantidad de liofilizado equivalente al volumen de medio de cultivo que se utilizó para renovar el cultivo; seguidamente, se incubó a 37°C durante 6 horas. De este modo se pretendía evitar el efecto conferido por la dilución del medio de cultivo en lo referente a la hipotética sustancia inhibidora.

Como control, además del habitual en el que se refrescan las células sin añadir liofilizado, se incluyó otro en el que se refrescaron las células con medio de cultivo preparado a una concentración doble, de este modo, se pretendió tener en consideración el aumento de nutrientes y osmolitos provenientes del liofilizado. Los resultados se muestran en la figura 35.



**Figura 35: Existencia de factores inhibidores de la expresión fenotípica al renovar el medio de cultivo.**

Como puede observarse en la gráfica de la figura 34, no se encuentra diferencia alguna si al diluir el medio de cultivo se añade un liofilizado de medio de cultivo en el que previamente se ha crecido otro cultivo de la misma cepa a temperatura permisiva. Estos resultados cuestionan la hipótesis que planteábamos acerca de la existencia de una sustancia inhibidora del ciclo celular secretada por las células al medio de cultivo.



#### 4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON Cdc15p.

A pesar de los numerosos intentos realizados, el detalle molecular de la función de la proteína Cdc15p permanece sin determinar (Surana y col., 1993; Spevak y col., 1993; Shirayama y col., 1994b; Toyn y col., 1996). Para definir los procesos en que Cdc15p está implicada sería de innegable ayuda el conocimiento de la interacción física, no sólo genética, de Cdc15p con otras proteínas.

Para abordar esta cuestión se decidió intentar clonar genes, cuyos productos interaccionaran con Cdc15p, utilizando el sistema de *dos híbridos* (Fields y Song, 1989). Esta técnica permite determinar y clonar genes, cuyos productos, unidos al dominio de activación del DNA del producto del gen *GAL4*, son capaces de interaccionar físicamente con uno dado que se usa como "cebo" y que se coloca en fase con el dominio de unión al DNA de dicho activador transcripcional. En nuestro caso se empleó como cebo la mitad carboxilo terminal de la proteína Cdc15p ya que se trata del dominio no proteína-quinasa y por tanto suponemos que específico o regulatorio de la función quinasa de la proteína.

Se diseñaron dos oligonucleótidos, el primero (2HA), contiene el punto de corte *SalI* (1249) y la secuencia contigua hacia 3' del gen *CDC15*, al que se añadieron, además, secuencias de corte para las enzimas *SmaI* y *XbaI* para poder clonarlo en fase con el dominio de unión al DNA del gen *GAL4*. El segundo oligonucleótido (2HB2), se diseñó en el terminador del gen *CDC15* (hacia 5' de la posición 3631) y se le introdujo una secuencia de corte para las siguientes enzimas: *SalI*, *XbaI* y *SmaI*. Se amplificó por PCR, usando los oligonucleótidos detallados y como DNA molde el gen *CDC15* en el plásmido pBS9. El fragmento amplificado, de 2.4 kb, se cortó con *SalI* y se intercambió por el fragmento resultante de cortar el plásmido pBS9 con *SalI*. Este nuevo plásmido (pBS9a), que porta el gen *CDC15*, pero cuya mitad 3' proviene de un amplificado por PCR, se transformó en una cepa mutante *lyt1*. Se eligió aquel plásmido que era capaz de complementar el fenotipo lítico, lo que indica que la reacción de polimerización de la PCR no ha cometido ningún error fenotípicamente detectable.

El plásmido pBS9a se cortó con *SmaI* obteniendo un fragmento de 2.4 kb, que se clonó en el punto *SmaI* del plásmido pGBT9 (ver capítulo de materiales y métodos). Para comprobar que se mantenía la fase de lectura entre el dominio de unión al DNA del gen *GAL4* y el fragmento cebo del gen *CDC15*, se secuenció la zona de unión entre ambos fragmentos génicos a través de un oligonucleótido fluoresceinado de secuencia, interno al dominio de unión al DNA de *GAL4* y cedido amablemente por la Dra. Molina (este departamento).

Una vez comprobada la construcción del cebo se transformó con ella la cepa HF7c de *S. cerevisiae*. Esta cepa tiene inactivos los genes *GAL4* y *GAL80* (inhibidor constitutivo del gen *GAL4*), además tiene integrado el gen *HIS3* bajo el promotor del gen *GAL1* y el gen *lacZ*, bajo el promotor del gen *GAL4*. Una vez comprobado que el plásmido cebo no activa la transcripción de los genes marcadores (*HIS3* y *lacZ*), se transformó una genoteca de *S. cerevisiae* en el plásmido pGAD13, que además porta el dominio de activación del gen *GAL4*.

Se rastrearon entorno a  $1.2 \times 10^6$  clones, de los cuales 112 fueron capaces de crecer en medio sin histidina. De estos 112, únicamente se eligieron 61 por ser capaces de producir  $\beta$ -galactosidasa, producto del gen marcador *lacZ*. A todos ellos se les hizo perder el plásmido cebo y se seleccionaron 18, que perdían la capacidad de producir la  $\beta$ -galactosidasa (el resto fueron considerados falsos positivos, ya que el plásmido de la genoteca era capaz de activar la transcripción del gen *lacZ* intrínsecamente, es decir, en ausencia del plásmido con el cebo). Se obtuvo el plásmido de la genoteca de los 18 positivos y se les retransformó de nuevo en la cepa HF7c, que portaba el plásmido cebo. Ninguno de ellos fue capaz de producir  $\beta$ -galactosidasa por lo que se les consideró, a todos ellos, falsos positivos.

## DISCUSIÓN

### 1. RESCATE ALÉLICO DE LA MUTACIÓN *lyt1*.

La mutación *lyt1* afecta al gen *CDC15* de *Saccharomyces cerevisiae*, como demuestran tanto los estudios de complementación del fenotipo termosensible como las características fenotípicas del diploide *cdc15-1/lyt1*. (Yuste, 1995). Continuando el trabajo realizado por la Dra. Yuste en este laboratorio, rescatamos y secuenciamos el alelo mutante *cdc15-lyt1* encontrando una única mutación, localizada fuera del dominio quinasa de la proteína Cdc15p y que afecta a la única zona del gen, excluyendo el dominio quinasa, que presenta similitud con *cdc7<sup>+</sup>*, un posible homólogo funcional del gen *CDC15* de *S. cerevisiae* en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Fankhauser y Simanis, 1994). La mutación induce el cambio de un residuo de glicocola, aminoácido no polar y con cadena lateral pequeña, por un glutámico, aminoácido cargado negativamente a pH fisiológico y con cadena lateral voluminosa. No parece descabellado especular que el cambio de residuos generado por la mutación pudiera modificar suficientemente la estructura de la proteína Cdc15p como para hacerla inestable y por ello inactiva a elevadas temperaturas. Estos resultados definen, por tanto, un nuevo dominio conservado, esencial para el mantenimiento de la estructura de la proteína Cdc15p. Actualmente, a excepción del citado *cdc7<sup>+</sup>* de *S. pombe*, no disponemos de los homólogos de este gen en otros organismos, lo que nos impide conocer la verdadera importancia de este dominio a lo largo de la escala filogenética.

Todos los alelos mutantes del gen *CDC15* secuenciados hasta el momento, exceptuando el alelo *cdc15-lyt1*, presentan la mutación en la región que codifica los dominios catalíticos característicos de las proteínas quinasas (Philippsen, comunicación personal; Shirayama y col., 1996). Estos resultados nos inducen a pensar que las diferencias fenotípicas que presentan las cepas portadoras de los distintos alelos mutantes pueden ser dependientes de alelo; sin embargo, como discutiremos en el siguiente apartado, la diferente expresión fenotípica observada en las distintas cepas se muestra independiente del alelo mutante empleado.

#### 1.1. LA SUSTITUCIÓN ALÉLICA DEL ALELO MUTANTE *cdc15-lyt1* EN UNA CEPA SILVESTRE.

A pesar de disponer de suficientes argumentos para asumir que la mutación *lyt1* de *S. cerevisiae* se encuentra en el gen *CDC15*, hemos tratado de sustituir, en una cepa silvestre, el alelo funcional por el alelo mutante *cdc15-lyt1*. Esta cepa, además de ser la prueba definitiva de la localización de la mutación *lyt1* en el gen *CDC15*, nos habría permitido disponer de una cepa isogénica silvestre de una cepa *lyt1*. Dichas cepas habrían sido de gran interés a la hora de llevar a cabo los ensayos de progresión a través del ciclo celular y, gracias a ellas, no habría sido necesaria la construcción de las cepas control por transformación con plásmidos que contenían los genes silvestres objeto de estudio.

Sin embargo no hemos sido capaces de realizar esta sustitución, ya que, una vez integrada la construcción de sustitución en el genoma de la cepa silvestre, no hemos conseguido ningún clon que, por recombinación, haya expulsado el alelo silvestre del gen *CDC15* y, por tanto, posea el alelo mutante *cdc15-lyt1*.

Las explicaciones a este hecho son múltiples: a pesar de utilizarse 45 clones distintos que llevan integrada la construcción de sustitución, puede que dicha integración no haya sido homóloga y no se haya introducido en el gen *CDC15*. Otra explicación, quizás más plausible, se basa en que la eliminación por recombinación homóloga del alelo mutante podría estar muy favorecida respecto de la eliminación del gen silvestre, por ello todos los clones capaces de crecer en 5-FOA presentan fenotipo silvestre.

## **2. FENOTIPO DE LOS MUTANTES EN EL GEN *CDC15*.**

El mutante *lyt1*, cuando es incubado a 37°C, se caracteriza por presentar lisis celular y alteraciones en el patrón de gemación (Molero y col., 1993). Las cepas haploides que portan esta mutación presentan un patrón de gemación distal, típico de las cepas diploides (Molero y col., 1993). A su vez, las cepas diploides con los dos alelos del gen *CDC15* mutados, presentan un fenotipo de células encadenadas con aspecto arrosariado.

### **2.1. EL FENOTIPO DE LOS MUTANTES *cdc15* ES INDEPENDIENTE DEL ALELO MUTANTE QUE PORTAN.**

Los resultados que hemos obtenido indican que las variaciones del fenotipo de las distintas cepas mutantes en el gen *CDC15* no dependen del alelo mutante que portan. Tanto si la mutación se encuentra en el dominio quinasa como en el dominio no quinasa, específico de la proteína Cdc15p, se obtienen proteínas no funcionales a temperatura restrictiva, que determinan idénticos rasgos fenotípicos.

Las características del fondo genético de las distintas cepas mutantes podrían ser las responsables de algunos de los rasgos fenotípicos diferenciales que hemos observado. Sin embargo, el análisis genético llevado a cabo en la cepa diploide MY1, que además de portar dos alelos mutantes distintos, deriva de diferentes fondos genéticos -uno que presenta una elevada expresión del fenotipo lítico (L2C24d) y otro donde no se expresa (RH210)-, indica que, en el caso de que exista influencia del fondo genético, ésta es compleja y escapa de un análisis genético sencillo, ya que el estudio de la segregación meiótica de esta cepa mutante no muestra un patrón mendeliano en la segregación del fenotipo lítico.

Sin embargo, sí hemos encontrado dependencia entre la expresión del fenotipo lítico y las condiciones ambientales en que se desarrolla el cultivo, como discutiremos posteriormente. En todo caso, el hallazgo de la dependencia entre la lisis y las condiciones de cultivo limita la importancia de la posible influencia del fondo genético en la expresión fenotípica.

La independencia del fenotipo respecto del alelo mutante objeto de estudio, nos ha permitido el uso de cualquiera de ellos, de acuerdo con nuestras necesidades, posibilitándonos

la extrapolación de los resultados al resto de cepas mutantes en el gen *CDC15* que hemos manejado.

## **2.2. ¿CORRESPONDE LA ESTRUCTURA APICAL ABERRANTE A UN PROCESO ANÓMALO DE GEMACIÓN?**

Molero y colaboradores (1993) postulan que las estructuras apicales características de los mutantes *cdc15*, se corresponden con intentos abortados de gemación. Si esto fuese cierto, la localización de las estructuras apicales polarmente erróneas dependería de las señales de polaridad generales de la célula. Para aclarar este aspecto, construimos la cepa doble mutante *cdc15-1 bud1::URA3*, la cual, a temperatura permisiva, gema al azar y a 37°C presenta una deslocalización, a lo largo de toda la célula, de las estructuras apicales aberrantes características de la mutación en el gen *CDC15*. La conclusión que podemos extraer de estos ensayos apoya el postulado que identifica las prolongaciones apicales del mutante *lyt1* con intentos anómalos de gemación. Otro resultado a favor de la hipótesis de la gemación anormal, lo encontramos en el hecho de que, al estabilizar osmóticamente el medio con sorbitol o con NaCl, los proyectos de gemación apicales, en las cepas haploides, consiguen eludir momentáneamente la lisis y dan lugar a cadenas de células unidas a modo de rosario, fenotipo similar al mostrado por las cepas diploides con o sin sorbitol en el medio.

Los resultados mostrados indican que la estructura apical aberrante que aparece en las células haploides de los mutantes en el gen *CDC15* es la manifestación de un proceso anómalo de gemación y no cualquier otro tipo de irregularidad morfogenética. Es decir, por algún motivo, que trataremos de discutir en los apartados siguientes, la mutación del gen *CDC15* hace perder a las células de las cepas haploides su patrón habitual de polaridad en la elección del sitio de gemación.

## **2.3. TOPOLOGÍA DE LA LISIS.**

Hemos observado que la lisis, topológicamente, tiene lugar precisamente por la estructura apical anómala de gemación (figura 18 del capítulo de resultados), hecho que podríamos explicar considerando que la maquinaria de la célula haploide no está preparada para acometer una gemación polar. La célula haploide, al verse obligada a modificar su patrón característico de polaridad, podría presentar dificultades importantes para generar una pared celular normal, dando lugar a una pared debilitada que provocaría la lisis celular. El sorbitol, al ser capaz de estabilizar ligeramente la pared de la levadura, permitiría que las incipientes yemas apicales se desarrollen un poco más antes de sufrir el proceso lítico y determinaría la aparición del fenotipo de células encadenadas, de forma análoga a lo manifestado por una cepa diploide con ambos alelos del gen *CDC15* mutados. Sin embargo, las estructuras celulares encadenadas de gran tamaño que muestran tanto las cepas diploides como las haploides en presencia de sorbitol, a temperatura restrictiva, pronto serían inestables y lisarían. Recientemente se ha implicado en la lisis celular a defectos en el proceso de septación y citoquinesis (Epp y Chant, 1997). De modo análogo se podría explicar la lisis que ocurre en los mutantes *cdc15*, ya que, como se discute en el siguiente apartado, éstos no son capaces de llevar a cabo el proceso de septación.

También es significativo el hecho de que la gemación apical aberrante de las células haploides tiene lugar, de modo general, en la célula hija, mientras que la célula madre pierde la capacidad para abordar un nuevo proceso de gemación. En las cepas diploides, en este aspecto, observamos un anómalo adelantamiento de la gemación de la célula hija respecto de la célula madre, fenómeno que discutiremos en los apartados siguientes. No hay que olvidar que en las cepas silvestres la gemación de la célula hija sufre un retraso respecto a la nueva gemación de la célula madre, debido a que ha de alcanzar un tamaño mínimo crítico, previamente a abordar la gemación (Roemer y col., 1996). Una explicación al hecho de que en la cepas haploides la célula madre pierde la capacidad de gemar, podemos encontrarla si consideramos que el fenómeno lítico sobreviene previamente al inicio del proceso de gemación de la célula madre.

En cualquier caso, resulta evidente la existencia de un retraso anómalo en la gemación de la célula madre respecto de la célula hija en las cepas diploides, efecto que se agudiza en cepas haploides, hasta el extremo de no llegar a producirse la gemación de la célula madre.

#### 2.4. IMPLICACIÓN DE Cdc15p EN EL PROCESO DE SEPTACIÓN.

Otro aspecto importante del fenotipo de los mutantes en el gen *CDC15*, radica en su incapacidad para iniciar y, por tanto, llevar a cabo el proceso de septación, como indican los resultados de microscopía de transmisión (figura 22 del capítulo de resultados). Este hecho es el determinante de la aparición de cadenas de células sin septar en cepas diploides, efecto que también se manifiesta en cepas tanto haploides como diploides, cuando se encuentran en presencia de sorbitol 1 M.

El defecto en la septación parece lógico dado que la actina no se polariza hacia la zona del septo para determinar su formación (Lew y Reed, 1993). Estos autores han descrito que, para que la actina se polarice en la zona del septo, es necesaria la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, pero los mutantes *cdc15* detienen su ciclo celular con elevada actividad quinasa Cdc28p-Clb2p (Surana y col., 1993).

Recientemente se ha descrito la proteína Iqg1/Cyk1p (Epp y Chant, 1997; Lippincott y Li, 1998). Estos últimos autores localizan a esta proteína en la zona del septo y la describen como esencial en el ensamblaje de un anillo de miosina imprescindible para que se lleve a cabo el proceso de septación. Lippincott y Li (1998), determinan, a su vez, la dependencia de todo el proceso anteriormente descrito a la presencia de la proteína Cdc15p activa. Estos datos reafirman la implicación del producto del gen *CDC15* en la septación de *S. cerevisiae*.

Otro dato que refuerza el papel del gen *CDC15* en el proceso de septación, la encontramos en la función de *cdc7<sup>+</sup>*, su homólogo en la levadura de fisión *S. pombe*. Los mutantes de *S. pombe* en el gen *cdc7<sup>+</sup>*, son incapaces de realizar el proceso de septación (Fankhauser y Simanis, 1994). No obstante, existe un rasgo diferenciador entre ambos homólogos y es que la sobreexpresión del gen *cdc7<sup>+</sup>* en *S. pombe* determina la aparición de múltiples rondas de septación sin abordar la división nuclear (Fankhauser y Simanis, 1994), efecto no observado al sobreexpresar, ni el gen *CDC15* completo de *S. cerevisiae* (Philipssen, comunicación personal), ni el dominio quinasa (resultados no mostrados). Este efecto no parece extraño, ya que la regulación del ciclo celular y la coordinación con el ciclo

morfogenético en ambos organismos, especialmente al final de la mitosis, manifiesta diferencias sustanciales (MacNeil y Nurse, 1997).

Recientemente se ha descrito el gen *spg1<sup>+</sup>* de *S. pombe*, homólogo funcional del gen *TEM1* de *S. cerevisiae* (Schmidt y col., 1997) como un gen esencial para la septación de la levadura de fisión, este dato, y a la vista de la relación genética y funcional que muestra con el gen *CDC15*, refuerza el papel, que proponemos en este trabajo, del gen *CDC15* en la septación de las células de *S. cerevisiae*.

## 2.5. INFLUENCIA DE LA SEPTACIÓN EN LA ELECCIÓN DEL PATRÓN DE POLARIDAD.

Existen evidencias que indican que el proceso de septación es fundamental para el establecimiento del patrón axial de gemación (Chant, 1996a). Los datos que nosotros hemos obtenido con los mutantes en el gen *CDC15* respaldan esta hipótesis, e indican que para que la célula elija el eje de polaridad axial, previamente ha de realizarse apropiadamente el proceso de septación. Resultados similares han sido obtenidos con mutantes en el gen *CDC10*, los cuales son capaces de iniciar la septación, pero no de localizar correctamente el septo, el cual, además, presenta una estructura anómala (Cid y col., 1998). Los mutantes *cdc10* también exhiben alteraciones en la elección del patrón de polaridad axial.

No hay que olvidar que el nuevo patrón de polaridad que muestran los mutantes con problemas en el proceso de septación es dependiente del sistema de polaridad general de las células, liderado por la GTPasa Bud1p. Como hemos descrito en el capítulo de introducción, existen unas señales, reconocidas por la maquinaria general del establecimiento polaridad, que determinan el patrón axial de gemación. Estas señales, hasta donde se conoce, están generadas por las proteínas Bud3p, Bud4p, Bud10p y Axl1p (Chant y col., 1995; Sanders y Herskowitz, 1996; Halme y col., 1996). Las tres primeras se localizan en la estructura de 10 nm, mantenida por las septinas en el cuello entre la célula madre y la hija. Los mutantes en la septina Cdc10p son incapaces de construir adecuadamente la estructura anular de 10 nm, de ese modo es previsible que las señales encargadas de marcar el patrón axial no se ensamblen correctamente y no sean capaces de atraer hacia ellas la maquinaria de polaridad celular, dirigiéndose ésta, por defecto, a las señales de polaridad permanentes que residen en los polos de la célula (Zahner y col., 1996). En los mutantes en el gen *CDC15* el resultado fenotípico es similar: tiene lugar un desplazamiento de la polaridad desde el patrón axial al bipolar. Sin embargo el anillo de septinas en los mutantes *cdc15* parece correctamente ensamblado, como demuestran ensayos llevados a cabo con la fusión de Cdc10p a la proteína verde. En estos mutantes el anillo de septinas permanece ensamblado, incluso cuando ya ha comenzado la gemación apical aberrante en la célula hija, hecho insólito ya que hasta ahora se postulaba que para comenzar una nueva gemación, previamente, las células tenían que desorganizar la estructura de septinas del anterior ciclo (Chant, 1996b). Estos resultados, además, refuerzan la propuesta del papel esencial de la septación para la correcta elección de la polaridad en el siguiente ciclo de división (Longtine y col., 1996). En los anteriores ensayos también cabe remarcar la incapacidad de los mutantes *cdc15* para localizar el anillo de septinas en la base del proyecto de gemación apical aberrante. La ausencia del anillo de septinas parece, pues, determinante en el fenotipo con constricciones anchas y anómalas similares a los *shmoos*, que muestran los mutantes en el gen *CDC15* en los proyectos de gemación apicales aberrantes que hemos descrito.

Recientemente se ha localizado a la proteína *cdc7* de *S. pombe* (homóloga de Cdc15p) en el cuerpo polar del huso, si bien, cuando se lleva a cabo la división del SPB, *cdc7* sólo aparece en uno de ellos (Sohrmann y col., 1998). Si esta distribución asimétrica se pudiera demostrar también en *S. cerevisiae*, sin duda obtendríamos importante información para explicar las anomalías en el patrón morfogenético que manifiestan los mutantes en el gen *CDC15*. Del mismo modo, y dentro del campo de la especulación, la distribución asimétrica de *CDC15* podría ser la clave para explicar la imposibilidad que muestra la célula madre para abordar un nuevo proceso de gemación en la células haploides de estos mutantes.

## **2.6. LOS MUTANTES *cdc15* NO MUESTRAN UNA PARADA ESTRICTA DEL CICLO CELULAR.**

Sorprendentemente, el fenotipo que hemos observado está en discordancia, no sólo con el fenotipo descrito hasta ahora para los mutantes *cdc15*, sino también con la propia definición de mutante *cdc*. Los mutantes *cdc* son aquellos que detienen el ciclo nuclear en un determinado momento, debido a la carencia de algún componente esencial para la progresión del mismo (Pringle y Hartwell, 1981). Nuestros resultados indican que los mutantes *cdc15* no detienen definitivamente el ciclo al final de la anafase (Culotti y Hartwell, 1971; Surana y col., 1993), sino que, al menos, en lo referente al ciclo morfogenético, superan la anafase del presente ciclo y entran de nuevo en el ciclo, produciendo, por tanto, una nueva ronda de gemación. El soslayo de la parada descrita, al menos por el ciclo morfogenético, abre dos opciones diferentes: (i) El ciclo nuclear se halla detenido y el ciclo morfogenético continúa con la gemación errónea que determina la lisis; es decir, se produce una descoordinación entre ambos ciclos; y (ii) El ciclo nuclear supera la parada en la anafase y discurre paralelamente al ciclo morfogenético. Nuestros datos indican que el ciclo morfogenético está acompañado por el ciclo nuclear, como lo demuestran las tinciones de núcleos en la cepas diploides (figura 24 del capítulo de resultados), donde cada célula de la cadena dispone de un núcleo (si hubiese descoordinación entre ambos ciclos, y el ciclo nuclear se encontrara detenido, la mayoría de las células de la cadena no dispondrían de núcleo). En las células haploides la lisis sobreviene previamente a la nueva división nuclear, sin embargo, ensayos de citometría (figuras 25, 26 y 27 del capítulo de resultados) demuestran que los núcleos se encuentran en la fase S, ya que presentan una cantidad de DNA superior a la esperada si los ciclos nucleares estuvieran parados en la anafase.

## **2.7. INFLUENCIA DE LA ESTABILIZACIÓN OSMÓTICA DEL MEDIO EN EL FENOTIPO DE LOS MUTANTES *cdc15*.**

Los resultados de la topología de la lisis, así como la explicación que hemos propuesto al fenómeno mostrado en las fotografías de la figura 18 del capítulo de resultados, donde ilustramos cómo la lisis celular sobreviene debido al cambio en la osmolaridad que sufren las células al ser trasladadas del medio de cultivo a una solución de yoduro de propidio, nos animó a realizar estudios acerca de la influencia de la osmolaridad del medio en el fenotipo de los mutantes en el gen *CDC15*. La comparación del comportamiento de las células en medio sin estabilizar y estabilizado osmóticamente es un método comúnmente utilizado para el estudio del estado de la pared celular (Torres y col., 1991).



Cuando los mutantes en el gen *CDC15* son incubados en un medio osmóticamente estabilizado, bien sea con sorbitol o con NaCl, observamos dos manifestaciones diferentes:

- En cepas haploides, protege a las células de la lisis, permitiéndoles continuar el ciclo celular, aunque de forma polarmente errónea, lo que determina la aparición de células encadenadas, de forma análoga al desarrollo fenotípico que presentan las cepas diploides en medio sin estabilizar.
- Aumenta de forma significativa la proporción de células que superan la parada del ciclo celular y abordan un nuevo ciclo, determinando la aparición de todas las aberraciones morfogénicas que hemos descrito. Este efecto se observa, incluso, en cepas como la RH210, la cual, en medio sin estabilizar, no es capaz de superar la parada del ciclo, mientras que en medio estabilizado osmóticamente, presenta una marcada proporción de células que se aventuran en una nueva fase S (ver tabla 10 del capítulo de resultados).

El primer efecto observado es predecible si se considera la acción del sorbitol 1 M como estabilizador osmótico, ya que compensa, momentáneamente (las células se acaban lisando), la función de una pared debilitada. Sin embargo, las células muestran, invariablemente, el fenotipo de pérdida del patrón de polaridad axial y la incapacidad de septar; es decir, en definitiva, la estabilización osmótica es incapaz de suprimir los defectos primarios de los mutantes en el gen *CDC15*. Estos resultados indican que el defecto primario de los mutantes *cdc15* es ajeno a la pared celular y que la lisis tiene lugar como efecto secundario a las disfunciones conferidas por la mutación. En este ámbito se han descrito otros mutantes afectados en el proceso de septación cuya manifestación última es la lisis celular, lo que parece indicar que una correcta septación es imprescindible para la integridad celular (Epp y Chant, 1997).

Más que el aparente efecto sobre la lisis celular, nos llama la atención el notable aumento en la proporción de células capaces de superar la parada del ciclo celular en presencia de un medio osmóticamente estabilizado. No disponemos de explicación para este fenómeno, pero nos informa sobre la sensibilidad que muestra la expresión del fenotipo termosensible frente a las variaciones de las condiciones ambientales.

### 3. CICLO CELULAR DE LOS MUTANTES ESTUDIADOS CON ANOMALÍAS EN EL FINAL DE LA MITOSIS.

Hasta ahora hemos discutido acerca de cómo los mutantes en el gen *CDC15* superan la parada del ciclo celular descrita clásicamente para ellos (Culotti y Hartwell, 1971; Surana y col., 1993). En las cepas diploides la parada del ciclo celular es superada tanto desde una perspectiva morfogénica, con la emergencia de una nueva yema, como desde el punto de vista del ciclo nuclear, con la división del núcleo de forma paralela a la gemación. A su vez, como discutíamos previamente, en las células haploides la replicación del material génico comienza, aunque no llega a manifestarse en la aparición de un nuevo núcleo independiente, debido al advenimiento del fenómeno lítico.

Parece claro, según lo discutido en el párrafo anterior, que no existe descoordinación entre el ciclo morfogénico y el nuclear, ya que ambos superan el punto de parada del ciclo celular al final de la mitosis.

¿Cómo explicar que los mutantes en el gen *CDC15* superan la parada del ciclo y se aventuran en un nuevo ciclo, determinando la aparición de aberraciones de polaridad que producen la lisis celular?. Una respuesta a esta pregunta la encontramos en la hipótesis formulada por Murray (1995), que postula que bajo la parada del ciclo celular de numerosos mutantes *cdc* se oculta un mecanismo del tipo *checkpoint*, que detecta las disfunciones conferidas por la mutación *cdc* y detiene el ciclo celular con el objeto de repararlas. Esta hipótesis es compartida por el grupo del Dr. Nasmyth (Surana y col., 1993), que centrándose en los mutantes *cdc15*, hipotetizan sobre la posibilidad de que la parada del ciclo celular de estos mutantes, pudiera ser debida a la activación de un punto de control del ciclo celular o *checkpoint*, que aseguraría la correcta consecución de la mitosis antes de abordar un nuevo ciclo celular.

De la definición de *checkpoint* se puede extraer que su manifestación fenotípica más notable es el retraso que sufre el ciclo celular debido a la detención del mismo, con el objeto de proporcionar el tiempo suficiente para reparar o solucionar las anomalías responsables de la activación de dicho punto de control. Así pues, la forma más simple y por ello, comúnmente empleada, para revelar la existencia de puntos de regulación del ciclo celular o *checkpoints*, consiste en detectar el retraso en el ciclo de las células, producido por ese punto de control celular, respecto de las células control, en las que no se manifiesta (Lew y Reed, 1995; Murray, 1995; Elledge, 1996; Yang y col., 1997; Toczyski y col., 1997).

#### 3.1. CICLO CELULAR DE LOS MUTANTES *cdc15*.

Disponemos de resultados previos que indican la existencia de un retraso en el ciclo celular de los mutantes *cdc15*. Hemos observado dicho retraso, por ejemplo, en la célula madre, respecto de la célula hija, en las cepas diploides (ver figura 16 del capítulo de resultados y el apartado 2.3. del presente capítulo). Así pues, llevamos a cabo ensayos de seguimiento del ciclo celular de los mutantes *cdc15*, con los que pretendimos determinar si existe algún retraso en el ciclo celular. Para ello, cronometramos el tiempo que transcurre desde que una célula, de una cepa mutante, (la célula madre) inicia la gemación hasta que su

hija comienza a emitir la yema apical errónea. De este modo si hubiera una detención momentánea del ciclo celular en la anafase mitótica, ésta quedaría reflejada en un aumento en el tiempo de gemación, respecto de una cepa control que no manifieste la parada del ciclo.

Para medir el tiempo que invierten los mutantes *cdc15* en la realización de su ciclo celular, elegimos la cepa L2C24d, dado que presenta una elevada proporción de células que superan la parada en la anafase. Como cepa control usamos la misma cepa L2C24d, pero transformada con el plásmido centromérico pBS9, portador del gen *CDC15* silvestre. La cepa control elegida, se comporta como silvestre a temperatura restrictiva y, además, el análisis del ciclo celular a temperatura permisiva no revela diferencia alguna entre esta cepa y la cepa mutante. Por ello admitimos que la cepa control elegida es apropiada para nuestros propósitos y que las diferencias que encontremos entre ella y la cepa mutante serán debidas al retraso en el ciclo celular que presentan las células mutantes.

Los resultados que recogimos muestran un retraso significativo de la cepa mutante en el gen *CDC15* respecto del control (45 minutos, ver tabla 13 del capítulo de resultados). Este dato parece indicar la existencia de un punto de control, sin embargo hay otras explicaciones alternativas que, con los resultados discutidos hasta el momento, no podemos descartar:

- La cepa mutante, por el hecho de no disponer de la función del gen *CDC15*, progresa más lentamente a través del ciclo celular, lo que podría dar cuenta del retraso observado.
- El retraso que manifiestan las células mutantes podría ser el resultado del tiempo que necesitan para reorientar el eje de polaridad desde la zona axial a la polar distal, con lo cual la única disfunción de estos mutantes sería la deslocalización del patrón axial de gemación como resultado del defecto en citoquinesis que presentan.

No obstante, como discutiremos en apartados posteriores, y a pesar de las anteriores argumentaciones, la forma más plausible de explicar los resultados que mostramos en este trabajo es la existencia de un punto de control del ciclo celular que se activa cuando la célula carece de la función de la proteína Cdc15p.

### 3.2. CICLO CELULAR DEL MUTANTE *tem1-3*.

La relación genética descrita entre los genes *CDC15* y *TEM1* (Shirayama y col., 1994b), así como el fenotipo similar de los mutantes de cada uno de estos genes, nos animó a estudiar el tiempo de gemación del mutante *tem1-3*. La cepa control que usamos, dado que en este caso disponíamos de ella, fue la cepa isogénica silvestre. El resultado que obtuvimos fue la existencia de un retraso significativo del ciclo celular (25 minutos, ver tabla 13 del capítulo de resultados), aunque menor al recogido para el mutante *cdc15*. La explicación para la reducción del retraso del ciclo celular podría deberse a diferencias intrínsecas a las cepas utilizadas. Pero, en todo caso, el retraso del ciclo encontrado en el mutante *tem1-3* parece lo bastante importante como para ser comparable al de los mutantes *cdc15*.

Quizás el aspecto más importante a resaltar de este resultado sea que el retraso del ciclo celular no es exclusivo de los mutantes en el gen *CDC15*; es decir, no es debido a la falta de la función de este gen concreto, sino a la ausencia de un mecanismo en el que, además, participan otros componentes, como el producto del gen *TEM1*. Tampoco hay que olvidar que

la relación entre ambos genes, así como su implicación en la septación, ya está descrita en *S. pombe* (Schmidt y col., 1997). La conjunción de estos resultados sugiere que *S. cerevisiae* también dispone de un mecanismo molecular integrado por distintos elementos y destinado a dirigir los últimos estadios de la mitosis. Una hipótesis similar, en cuanto a la estructuración del mecanismo, ha sido propuesta por el grupo del Dr Toh-e (Shirayama y col., 1994b), los cuales proponen una ruta de transducción de señales destinada a determinar el final de la mitosis, en la que se encontraría implicado un grupo de quinasas formado por Cdc5p, Cdc15p, Dbf2p y una GTPasa de pequeño tamaño (Tem1p). Esta opinión, aunque desde un punto de vista exclusivamente centrado en el ciclo nuclear, es compartida por el grupo del Dr Johnston (Toyn y col., 1996), que involucra a todo este grupo de proteínas, junto con Sic1p, en la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p. Sin embargo, en virtud a los resultados obtenidos en este trabajo, resulta evidente la implicación de todo este grupo de proteínas (Cdc15p, Tem1p, Dbf2p, Cdc14p) en la regulación de eventos morfogénicos, pudiéndose explicar su reflejo en el ciclo nuclear por el hipotético *checkpoint* introducido anteriormente.

### 3.3. CICLO CELULAR DEL DOBLE MUTANTE *cdc10-11 cdc15-1*.

Los mutantes *cdc15* son incapaces de septar. Para estudiar si la ausencia o las disfunciones en el proceso de septación son las responsables del retraso en el ciclo celular observado en los mutantes del gen *CDC15*, medimos el tiempo de gemación en el mutante *cdc10-11*, el cual es capaz de iniciar el proceso de septación, pero no de localizar el septo en el lugar preciso, presentando éste, además, una morfología anormal (Cid y col., 1998). La cepa control que empleamos fue la cepa isogénica silvestre. Sorprendentemente, el resultado que obtuvimos fue un ligero retraso (8 minutos, ver tabla 13 del capítulo de resultados) de la cepa mutante respecto de su isogénica y que creemos puede ser explicable, no por un mecanismo de control del ciclo, sino más bien por el desarrollo morfogénico aberrante que muestra la célula hija, ya desde el momento de su emergencia. Esta morfología anormal, con yemas alargadas y aspecto tubular a lo largo de todo su desarrollo, está descrito que es consecuencia del deficiente ensamblaje del anillo de septinas, que determina el crecimiento hiperpolarizado de la yema (Longtine y col., 1996).

El tiempo normal en el ciclo celular de los mutantes *cdc10-11*, nos animó a realizar los ensayos de *timing* con una cepa doble mutante *cdc10 cdc15*.

El resultado obtenido manifiesta que los dobles mutantes *cdc10 cdc15* no presentan retraso alguno en su ciclo celular (ver tabla 13 del capítulo de resultados) indicando que, en un fondo genético *cdc10*, los mutantes *cdc15* no muestran retraso en el ciclo celular.

Este resultado, invalida las explicaciones alternativas al retraso del ciclo celular de los mutantes *cdc15* discutidas en el apartado 3.1. del presente capítulo, ya que, el doble mutante *cdc10 cdc15* muestra los mismos rasgos fenotípicos que conducen a la lisis del mutante *cdc15*, pero sin presentar retraso en el ciclo celular. Es decir, el retraso observado en los mutantes *cdc15* o *tem1-3*, no es debido a un desarrollo más lento del ciclo del mutante *cdc15* o *tem1-3*, ni a los problemas en la polaridad mostrados por ambos mutantes. La ausencia de retraso en el ciclo celular del doble mutante *cdc10 cdc15* es la prueba más importante de que disponemos para soportar la hipótesis de la existencia de un *checkpoint*, que se encargaría de dar cuenta de la correcta finalización de la mitosis. Además, estos resultados vinculan a la estructura determinada por el anillo de septinas en el mecanismo del posible *checkpoint* que proponemos.

Otra importante línea argumental que abre el fenotipo del doble mutante *cdc10 cdc15* la encontramos al intentar explicar el fenómeno hallado. La ausencia de retraso en el ciclo celular que muestran los mutantes *cdc15* cuando se encuentran en un fondo genético *cdc10*, nos incita a pensar que el anillo de septinas podría estar involucrado en el *checkpoint*. Sin embargo, no parece sencillo explicar cómo unas proteínas de carácter estructural pueden desempeñar una función señalizadora, más propia de componentes enzimáticos del tipo proteína quinasa. La explicación tal vez haya que buscarla en la gran cantidad de proteínas que se ensamblan y colocan con el anillo de septinas (Chant y col., 1995; Sanders y Herskowitz, 1996; Halme y col., 1996; de Marini y col., 1997). Así pues, un anillo deficiente por la mutación en el gen *CDC10*, podría impedir o dificultar la localización en él de los componentes del punto de control encargados de activar el *checkpoint*.

No obstante, la hipótesis de la existencia de un punto de control del ciclo celular que proponemos, no deja de ser aventurada mientras no se describan los componentes del mismo, encargados de su señalización, los cuales de acuerdo a lo propuesto, probablemente haya que buscarlos en las proteínas que se localizan en el anillo de septinas. La actuación sobre el ciclo celular de este mecanismo, parece obvio que sería a través de la inhibición y la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, lo cual detendría el ciclo celular en la anafase mitótica, sin embargo, resta por determinar el detalle molecular del mecanismo de acción encargado de llevarla a cabo.

### 3.4. ¿QUÉ OCURRE CON LA CÉLULA MADRE?

En las cepas haploides mutantes en el gen *cdc15*, como hemos discutido previamente, la célula madre pierde la capacidad de abordar una nueva gemación a temperatura restrictiva (ver figura 16 del capítulo de resultados). Una explicación a esta observación, como ya hemos discutido, puede encontrarse si se considera que la célula madre no dispone de tiempo suficiente para abordar la gemación, antes de que ocurra el fenómeno lítico.

En todo caso, los resultados obtenidos indican que la célula madre es más sensible a la parada del ciclo celular que la célula hija, o, explicado de otro modo, la parada del ciclo celular determinada por el *checkpoint*, es más efectiva en la célula madre que en la hija; resultado que no es fácil de explicar, considerando que, debido a la ausencia de septación, los citoplasmas de ambas células se encuentran comunicados. No obstante, sí nos permiten especular sobre la existencia de distintos mecanismos de regulación y coordinación de la instauración de la polaridad entre la célula madre y la hija.

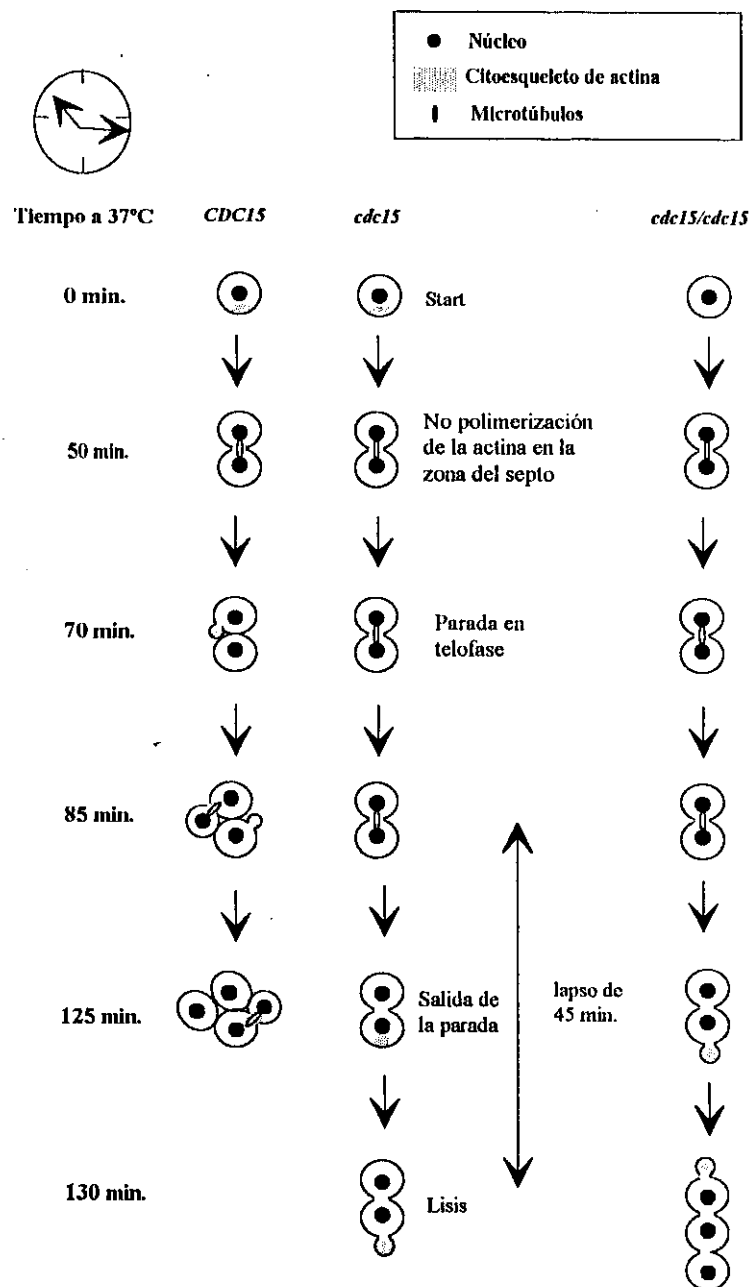
La herramienta para estudiar el retraso de la célula madre, lo encontramos en las cepas diploides, que portan ambos alelos mutantes, ya que sí son capaces de comenzar un nuevo proceso de gemación, como se muestra en la figura 16 y en la tabla 10 del capítulo de resultados. Los resultados obtenidos a partir del estudio del ciclo celular de cepas diploides mutantes en ambos alelos del gen *CDC15*, corroboran y cuantifican la observación previa (ver tabla 16 del capítulo de resultados), permitiéndonos asumir que, de modo general, en las cepas diploides, la efectividad en la detención del ciclo celular por parte del punto de control, es menor a la manifestada en las cepas haploides. Esta menor efectividad posibilita: (i) la superación de la parada del ciclo por parte de la célula madre y (ii) determina un retraso menor en el ciclo celular de la célula hija, en comparación con el de las cepas haploides.

La hipótesis de una mayor sensibilidad de la célula madre a la parada del ciclo celular por parte del *checkpoint*, se encuentra comprometida por el fenotipo del mutante *cdc10* y del doble mutante *cdc10 cdc15*, los cuales no manifiestan la parada del *checkpoint*, pero sí el retraso en la gemación de la célula madre respecto de la hija. Estos resultados parecen implicar al defecto en la septación como responsable del incremento del retraso o de la incapacidad de gemar (según sean diploides o haploides) por parte de la célula madre. La diferencia entre cepas haploides y diploides quizás esté en el distinto patrón de polaridad que muestran, así en las células haploides se sumaría el defecto de septación al cambio en el patrón de polaridad que sufren, lo que les impide gemar. Las células diploides únicamente sufrirían el efecto de la ausencia de septación, ya que no han de modificar su patrón de polaridad, por ello el efecto sería menor y simplemente observamos un retraso mayor al mostrado por la célula hija.

Estos resultados indican que en la célula madre ocurre un doble efecto, primero un retraso del ciclo debido al *checkpoint* y segundo otro retraso debido, posiblemente, a la ausencia del proceso de septación, este segundo efecto es más importante en las células haploides.

Una explicación al diferente comportamiento que manifiestan la célula madre y la hija en su desarrollo morfogénico, podríamos encontrarla si se demostrara la distribución asimétrica de Cdc15p en *S. cerevisiae*, de forma análoga a como ocurre con *cdc7* en *S. pombe* (Sohrmann y col., 1998).

En la figura 36 se muestra un esquema con una escala temporal aproximada de los procesos de gemación y retrasos que hemos encontrado. En ella intentamos representar los eventos nucleares y morfogénicos más importantes en las cepas mutantes haploides y diploides en el gen *CDC15*, en comparación con los mismos sucesos en células de una cepa silvestre.



**Figura 36:** Esquema temporal aproximado de la progresión a través del ciclo celular de los mutantes *cdc15*, en cepas haploides y diploides, comparado con la de una cepa silvestre. Para más detalle ver materiales y métodos y el apartado 3 del capítulo de resultados.

#### 4. EL FINAL DE LA MITOSIS.

Para la progresión del ciclo celular a través de la anafase y la terminación de la mitosis es imprescindible la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p (Murray y Kirschner, 1989; Surana y col., 1993; Lew y Reed, 1993). El detalle molecular de los mecanismos involucrados en inactivar el complejo director del ciclo celular, permitiendo la conclusión de la mitosis, permanecen oscuros. No obstante, distintos autores postulan la existencia de dos rutas paralelas destinadas a este fin: (i) el grupo de quinasas y sus reguladores, donde se integran los productos de los genes *DBF2*, *DBF20*, *CDC15* y *CDC5*, una GTPasa de pequeño tamaño codificada por *TEM1* y una fosfatasa codificada por *CDC14* (Shirayama y col., 1994b; Toyn y col., 1996) y (ii) un inhibidor de la función de Cdc28p-Clb2p, codificado por el gen *SIC1*, que se expresa en este momento del ciclo celular (Toyn y col., 1996). Por otra parte, no conviene olvidar el papel que juega el cAMP en estos estadios del ciclo, ya que la reducción de sus niveles, de alguna manera sin determinar, regula la consecución de la mitosis (Spevak y col., 1993). También hay que considerar la implicación del ciclosoma en la ubiquitinación de Clb2p y de inhibidores de la progresión del ciclo, como Pds1p (Schwab y col., 1997).

Teniendo en cuenta las hipótesis expuestas, el retraso del ciclo celular que hemos observado podría explicarse si se admite que las células que carecen de la ruta de las quinasas para la desactivación del complejo director del ciclo celular (mutantes *cdc15*, *tem1*, etc.), disponen de otras rutas alternativas para ese fin. Pero lógicamente, la desactivación del complejo Cdc28p-Clb2p, sería menos eficiente, ya que las células de estos mutantes no poseerían todos los mecanismos habituales dispuestos para este fin. Este argumento explicaría el retraso, que hemos observado, en el ciclo celular de los mutantes *cdc15* y *tem1*.

Sin embargo, la argumentación anterior, no es capaz de explicar el defecto en septación que hemos observado en los mutantes *cdc15*, *tem1*, *dbf2* y *cdc14*. El defecto en septación que muestran los mutantes en estos genes, unido a la homología que presentan los genes *CDC15* y *TEM1* con genes esenciales para la septación en *S. pombe*, como son los genes *cdc7<sup>+</sup>* y *spg1<sup>+</sup>*, da cuerpo a la implicación de estos genes en procesos morfogénicos relacionados con la septación, independientemente de la función descrita en cuanto a la progresión del ciclo.

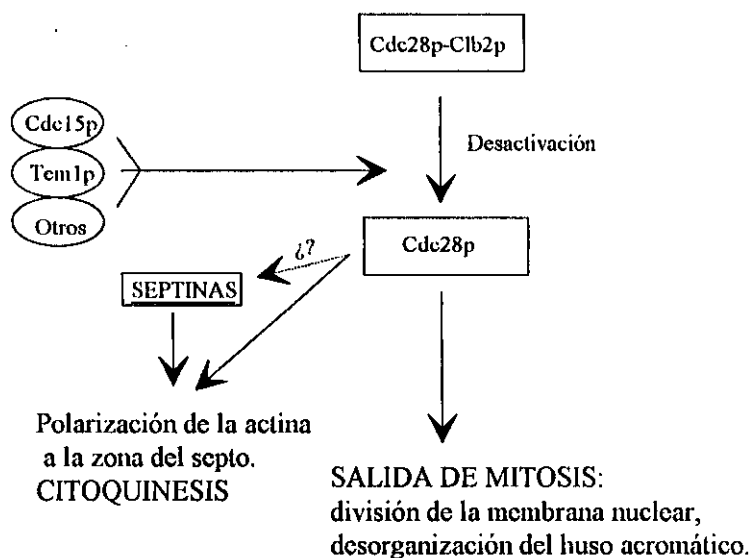
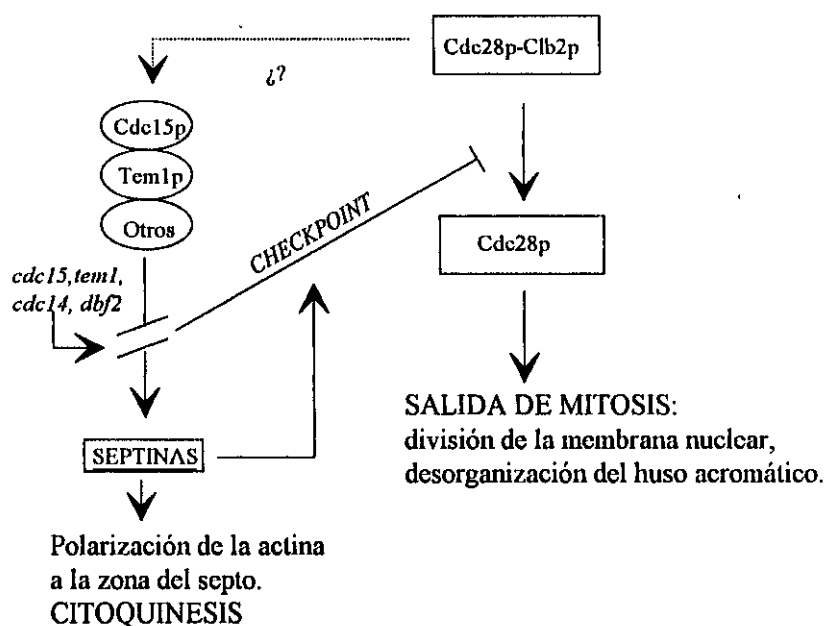
Por otra parte, la hipótesis clásica que implica a *cdc15p* exclusivamente en la progresión del ciclo celular, tampoco es capaces de explicar el fenotipo del doble mutante *cdc10 cdc15*, el cual carece de la ruta de las quinasas propuesta para la desactivación de Cdc28p-Clb2p y sin embargo, no manifiesta retraso alguno en el ciclo celular.

La discordancia de los resultados que hemos obtenido con las hipótesis existentes, expuestas anteriormente, sobre el funcionamiento y regulación de los eventos del final de la mitosis, nos incita a proponer un nuevo mecanismo de actuación en el final de mitosis. En esta nueva hipótesis, el producto del gen *CDC15*, junto con las proteínas Dbf2p, Cdc14p y Tem1p, cuyos mutantes muestran un fenotipo similar al del mutante *cdc15*, podrían estar implicadas, con independencia de otras funciones, en la transmisión de la señal de septación, desde la maquinaria de progresión del ciclo celular hasta la zona del septo, y más concretamente a la estructura de 10 nm formada por las septinas. Esta señal, determinaría la polarización, a la zona del futuro septo, del citoesqueleto de actina y el crecimiento polarizado necesario para la construcción del tabique entre ambas células (figura 37).



Además, teniendo en cuenta los resultados que hemos obtenido, proponemos que la detención del ciclo celular observada en los mutantes *cdc15*, *dbf2*, *tem1* y *cdc14*, podría ser debida a la activación de un punto de control celular o *checkpoint*, capaz de detectar anomalías en el final de la mitosis y detener el ciclo celular. Nuestros resultados indican que el funcionamiento del punto de control propuesto depende, a su vez, del correcto ensamblaje del anillo de 10 nm, formado por las septinas en el cuello entre la célula madre y la hija. La explicación más atractiva a este resultado, se basa en que, en la estructura determinada por las septinas, se localizaría un elemento esencial para la activación del punto de control, en respuesta a las disfunciones ocasionadas por la mutación en los anteriores genes. La señal producida por este factor desde el anillo de septinas, y a través de un mecanismo por determinar, evitaría la inactivación del complejo Cdc28p-Clb2p y, por tanto, detendría el ciclo celular en la anafase, en espera de la reparación de las anomalías causadas por la ausencia de las proteínas Cdc15p, Cdc14p o Tem1p.

En la figura 37 se muestra gráficamente la hipótesis clásica y la hipótesis que proponemos, a la vista de nuestros resultados, sobre los mecanismos involucrados en la terminación de la mitosis.

**A: HIPÓTESIS CLÁSICA****B: HIPÓTESIS DEL CHECKPOINT MORFOGENÉTICO.**

**Figura 37:** Hipótesis sobre la regulación de la salida de la mitosis. En la parte superior representamos el esquema clásico. En parte la inferior representamos la hipótesis que integra la existencia de un *checkpoint* y la implicación de Cdc15p en septación que proponemos, como explicación a los resultados obtenidos.

## 5. IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR DONDE SE ENCUENTRA INVOLUCRADA Cdc15p.

A pesar de los numerosos intentos encaminados a esclarecer el mecanismo molecular en el que se incluye la función del producto del gen *CDC15* (Surana y col., 1993; Spevak y col., 1993; Toyn y col., 1996), éste permanece oscuro. Como describíamos en el capítulo de introducción, existe una complicada red de interacciones entre una nutrida cantidad de proteínas que mantienen relaciones de complementación pero, a pesar de los esfuerzos realizados (Shirayama y col., 1994b, Toyn y col., 1996), no se ha llegado a definir una ruta o una jerarquía clara entre ellas.

Como estrategia para aportar información sobre el mecanismo de actuación de Cdc15p, nos propusimos encontrar proteínas relacionadas físicamente con ella y, de este modo, acotar el ambiente molecular en que Cdc15p ejerce su función, lo que facilitaría el desenmarañamiento de los datos de interacción genética.

La técnica que decimos emplear, fue el rastreo de una genoteca de *S. cerevisiae*, mediante el sistema de *dos híbridos* (Fields y Song, 1989; Chien y col., 1991). Elegimos el extremo carboxilo terminal de Cdc15p para usarlo como “cebo” del rastreo, ya que en este dominio se halla la secuencia no quinasa, específica o reguladora de la función de la proteína Cdc15p y, por tanto, más susceptible de interactuar con otras proteínas. Otro motivo para elegir la zona carboxilo terminal de Cdc15p, fue que, es en este dominio, donde se encuentra la mutación del alelo *cdc15-lyt1*.

De los  $1.2 \times 10^6$  clones rastreados, únicamente 112 fueron capaces de activar la expresión del gen indicador, pero todos ellos resultaron ser falsos positivos. Evidentemente, con los clones conseguidos, no se encuentra agotado el rastreo, pero sí nos parecen suficientes como para haber obtenido algún resultado positivo. Lo cual, nos hace sospechar la posibilidad de que, la fusión del dominio carboxilo terminal con el dominio de unión al DNA de *GAL4*, no mantiene su estructura nativa, lo que impediría cualquier interacción. La solución a este problema, quizá haya que buscarla en la construcción de otra fusión que sí conserve la estructura nativa de la proteína Cdc15p o, al menos, la capacidad de interactuar con alguna de las proteínas con quienes lo hace *in vivo*. Otra posibilidad a tener en cuenta, radica en la posibilidad de usar como “cebo”, para el rastreo de *dos híbridos*, el dominio proteín-quinasa de Cdc15p, ensayo que, tal vez, nos permitiera establecer la identidad de los sustratos de esta quinasa.

Otra alternativa a considerar, a la vista de los últimos resultados publicados en *S. pombe* (Sohrmann y col., 1998), que revelan la interacción entre *cdc7* y *spg1*, homólogos de Cdc15p y Tem1p respectivamente; reside en la posibilidad de realizar ensayos de *dos híbridos* dirigidos a detectar la posible interacción entre estas dos proteínas.

Los oligonucleótidos empleados para construir la fusión del dominio carboxilo terminal de Cdc15p al dominio de unión al DNA de Gal4p, fueron diseñados incluyendo las dianas de restricción adecuadas (ver materiales y métodos) para, además de la fusión del *dos híbridos*, poder realizar otra fusión de Cdc15p con GST. Este hecho, posibilitará una estrategia

alternativa para la búsqueda de proteínas que interaccionen con Cdc15p, a través de ensayos de coprecipitación.

## 6. HOMÓLOGOS DEL GEN *CDC15* EN OTROS ORGANISMOS.

Está descrito que el homólogo en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* del gen *CDC15* es el gen *cdc7<sup>+</sup>* (Fankhauser y Simanis, 1994); sus funciones, implicación en el proceso de septación, localización, semejanzas y diferencias con *CDC15*, ya han sido discutidas a lo largo del presente capítulo.

El carácter esencial del gen *CDC15* de *S. cerevisiae* nos incitó a iniciar la búsqueda de su homólogo en la levadura patógena *Candida albicans*, ya que, esta supuesta característica le confiere gran interés como diana para el desarrollo de antifúngicos. En nuestro departamento, previamente, se realizaron numerosos esfuerzos destinados a clonar el gen homólogo, en *C. albicans*, del gen *CDC15* de *S. cerevisiae*. Se llevó a cabo el rastreo de una genoteca genómica, en un vector episómico, sobre el mutante *cdc15-lyt1*. Este rastreo permitió clonar el gen *CLT1*, que codifica una proteína de la familia de las proteínas Ras, supuesto homólogo del gen *TEM1* de *S. cerevisiae* (San José, comunicación personal).

Debido a lo infructuoso de la primera aproximación intentada, decidimos realizar un rastreo, sobre la cepa L2C24d (*cdc15-lyt1*), pero empleando una genoteca construida en el vector centromérico pYEURA3, cedida amablemente por el Dr. Plá (Este departamento). Analizamos  $2 \times 10^5$  transformantes y conseguimos aislar dos plásmidos capaces de complementar el fenotipo autolítico termosensible de la cepa L2C24d. El análisis realizado en ambos plásmidos nos permitió concluir que portaban un inserto idéntico (datos no presentados). A partir de ellos, acotamos y secuenciamos un fragmento génico con elevada similitud a una proteína fosfatasa de *S. cerevisiae* codificada por el gen *CDC14* (45% de residuos idénticos y 58% de residuos similares). El gen clonado no se encuentra completo, sino que a juzgar por su similitud con *CDC14* de *S. cerevisiae*, le faltan, únicamente, unos quince pares de bases. A diferencia del gen de *S. cerevisiae*, presenta una secuencia intrónica teórica en su extremo 5'.

En *S. cerevisiae* una copia extra del gen *CDC14* es suficiente para complementar la mutación *cdc15* (Shirayama y col., 1996), estos autores también describen que la actividad fosfatasa del producto del gen *CDC14* de *S. cerevisiae* no es precisa para la complementación sobre los mutantes *cdc15*. Sin embargo, resulta muy llamativa la complementación heteróloga en un vector centromérico, del que suponemos *CaCDC14*, sobre el fenotipo *lyt1*, para la cual, además, no es necesaria la zona carboxilo terminal de la proteína.

Una explicación hipotética a la complementación en monocopia del fenotipo *lyt1* por un fragmento del gen *CDC14* de *C. albicans*, podría deberse a que la proteína Cdc14p, aparte de su posible actividad fosfatasa, podría “socorrer” el plegamiento de las moléculas de la proteína Cdc15p mutadas, y por tanto mal plegadas a temperatura restrictiva (no hay que olvidar que son mutaciones termosensibles), de manera que les permitiría mantener la estructura nativa y activa. En cualquier caso, la complementación en monocopia da idea de la importancia de la estequiometría en este hipotético complejo.

El plásmido CA48B, donde se encuentra acotado el fragmento génico clonado (ver materiales y métodos), no es capaz de complementar el fenotipo de un mutante *cdc14-1*, lo cual es fácilmente explicable, si se tiene en consideración que, en este plásmido, no se encuentra íntegro el gen *CaCDC14*.

Los sucesivos fracasos, a pesar del elevado número de clones rastreados en ambas genotecas, parecen desaconsejar el empleo de esta estrategia en la clonación del homólogo del gen *CDC15* de *S. cerevisiae* en *C. albicans*. Estos resultados nos incitan a suponer que, al igual que ocurre con *cdc7<sup>+</sup>* (Fankhauser y Simanis, 1994), el homólogo de *C. albicans*, no es capaz de complementar el fenotipo del mutante *cdc15* de *S. cerevisiae*, lo que nos obligará a adoptar otras estrategias para su clonación.



## CONCLUSIONES

1- El fenotipo de los mutantes *lyt1* de la levadura *S. cerevisiae* es originado por una única mutación, que produce el cambio de la G en la posición 1639 por una A, en el gen *CDC15*. Dicha mutación induce el cambio de la Gly 410 por un Glu y se localiza fuera del dominio quinasa, en una zona conservada en *cdc7<sup>+</sup>*, el homólogo en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

2- La lisis de los mutantes en el gen *CDC15*, a temperatura restrictiva, se produce por la incipiente gemación apical, polarmente anómala, que presenta la célula hija. La estabilización osmótica del medio de cultivo, es capaz de ralentizar la lisis celular pero no de evitarla, lo que implica que la disfunción de los mutantes en el gen *CDC15* no recae directamente sobre la pared celular.

3- Los mutantes en el gen *CDC15* son incapaces de iniciar y, por tanto, de llevar a cabo, el proceso de septación. El defecto en la septación podría ser el responsable de la pérdida del patrón de polaridad axial, mostrado por las cepas haploides que portan esta mutación.

4- Los mutantes *cdc15* son capaces de superar la parada del ciclo celular descrita para ellos al final de la anafase, iniciando una nueva fase S, sin haber concluido la anterior ronda mitótica.

5- Los mutantes en los genes *CDC15* y *TEM1* presentan un retraso en el ciclo celular de la célula hija, mientras que la célula madre, en cepas haploides, pierde la capacidad de abordar una nueva gemación. Por su parte, el doble mutante *cdc15 cdc10* no muestra retraso alguno en el ciclo celular. La explicación propuesta es la existencia de un punto de control o *checkpoint*, encargado de vigilar la correcta consecución de los últimos estadios del ciclo celular, para cuyo funcionamiento es esencial la integridad del anillo de septinas. Dicho punto de control manifiesta menor eficacia en la detención del ciclo en las cepas diploides, lo que se traduce, en una disminución del retraso sufrido por el ciclo celular de la célula hija y la posibilidad de abordar una nueva gemación por parte de la célula madre.

6- La superación de la parada del ciclo celular, o lo que es lo mismo, la desactivación del hipotético *checkpoint*, que determina la aparición de todos los rasgos fenotípicos característicos de los mutantes *cdc15*, presenta estrecha dependencia con las condiciones ambientales y con el fondo genético de las cepas mutantes empleadas.





## BIBLIOGRAFÍA

Adames, N., Blundell, K., Ashby, M.N. y Boone, C. (1995) Role of yeast insulin degrading enzyme homologs in pheromone processing and bud site selection. *Science* **270**: 464-467.

Amatruda, J.F. y Cooper J.A. (1992) Purification, characterization and immunofluorescence localization of *Saccharomyces cerevisiae* capping proteins. *J. Cell Biol.* **117**: 1067-1076.

Amberg, D.C., Zahner, J.E., Mulholland, J.W., Pringle, J.R. y Botstein, D. (1997) Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol. Biol. Cell* **8**: 729-753.

Amon A., Tyers M., Futcher B. y Nasmyth, K. (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74**: 993-1007.

Amon, A. (1996) Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast. *Cell* **84**: 651-654.

Amon, A., Spevak, W., Muroff, I. y Nasmyth, K. (1992). Possible involvement of the Cdc20 gene product in microtubule disassembly. *Yeast* **8**: S314.

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1993). Current protocols in molecular biology (New York: Greene Publishing Associates y Wiley Interscience).

Beckner, S.K., Hattori, S. y Shih, T.H. (1985) The *ras* oncogen product p21 is not a regulatory component of adenylate cyclase. *Nature* **317**: 71-72.

Bender, A. y Pringle J.R. (1989). Multicopy suppression of the *CDC24* budding defect in yeast by *CDC24* and three newly identified genes including the *ras*-related gene *RSR1* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9976-9980.

Blondel, M. y Mann, C. (1996). G2 cyclins are required for the degradation of G1 cyclins in yeast. *Nature* **348**: 279-282.

Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A. y Bussey, H. (1990). Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall  $\beta$ -glucan assembly. *J. Cell Biol.* **110**: 1833-1843.

Botstein, D. Chervitz, S.A. y Cherry, M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* **277**: 1259-1260.

Brewster, J.L., Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. y Gustin C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.

Brockerhoff, S.E. y Davis, T.N. (1992). Calmodulin concentrates at regions of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **118**: 619-629.

Brown, J.L., Kossaczka, Z., Jiang, B. y Bussey, H. (1993). A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1-6)- $\beta$ -glucan synthesis. *Genetics* **133**: 837-849.

Bueno, A., Richardson, H.E., Reed, S.I. y Russel, P. (1991). A fission yeast B-type cyclin functioning early in the cell cycle. *Cell* **66**: 149-159.

- Bulawa, C.E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 505.
- Byers, B. y Goetsch, L. (1976). A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J. Cell Biol.* **69**: 717-721.
- Cabib, E., Drgon, T., Drgonová, J., Ford, R.A. y Kollár R. (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochemical Society Transactions* **25**: 200-204.
- Cabib, E. y Durán, A. (1975). Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at non permissive temperatures. *J. Bacteriol.* **124**: 1604-1606.
- Carr, A.M. (1996). Checkpoints taking the next step. *Science* **271**: 314-316.
- Castro, C., Ribas, J.C., Valdivieso, M.H., Varona, R., del Rey, F. y Durán, A. (1995). Papulacandin B resistance in yeast: isolation and characterization of *PBR1*, a gene involved in (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:5732.
- Cid, V.J. (1996). Tesis doctoral.
- Cid, V.J., Cenamor, R., Nombela, C. y Sánchez, M. (1998). Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. Enviada para su publicación.
- Cid, V.J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. y Sánchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**:345-386.
- Copelan, C.S. y Snyder, M. (1993). Nuclear pore complex antigens delineate nuclear envelope dynamics in vegetative and conjugating *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 235-249.
- Courchesne, W.E., Kunisawa, R., y Thorner, J. (1989). A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* **58**: 1107-1119.
- Crews, C., Alessandrini, A., y Erikson, R.L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**: 478-480.
- Cross, F.R. (1988). *DAF1*, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Col. Cell Biol.* **8**: 4675-4684.
- Cross, F.R. (1995). Starting the cell cycle: what's the point?. *CurrentOpinion Cell Biol.* **7**: 790-797.
- Cross, F.R. y Tinkelenberg, A.H. (1991). A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expresion at the strat of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875-883.
- Culotti, J. y Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of cell division cyclein yeast. III. Seven genes controlling nuclear division. *Exp. Cell Res.* **67**: 389.
- Cvrcková, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R. y Nasmith, K. (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev.* **9**: 1817-1830.
- Chant, J. (1994). Cell polarity in yeast. *Trends Genet.* **10**: 328-333.
- Chant, J. (1996a). Septin scaffolds and cleavage planes in *Saccharomyces*. *Cell* **84**: 187-190.
- Chant, J. (1996b). Generation of cell polarity in yeast. *Curr. Biol.* **8**: 557-565.

Chant, J. y Herskowitz, I. (1991). Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* **65**: 1203-1212.

Chant, J. y Pringle, J.R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Bio.* **129**: 751-765.

Chant, J. y Stowers, L. (1995). GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis and more. *Cell* **81**:1-4.

Chant, J., Corrado, K., Pringle, J.R. y Herskowitz, I. (1991). Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud-site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell* **65**:1213-1224.

Chant, J., Mischke, M., Mitchell, E., Herskowitz, I. y Pringle, J.R. (1995). Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J. Cell Biol.* **129**: 767-778.

Chenevert, J., Corrado, K., Bender, A., Pringle, J.R. y Herskowitz, I. (1992). Yeast gene (*BEM1*) necessary for cell polarization whose products contain two SH<sub>3</sub> domains. *Nature* **356**: 77-79.

Chien, C., Bartel, P.L., Sternglanz, R. y Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9578-9582.

De Nobel, J.G., Klis, F.M., Ram, A., van Unen, H., Priem, J., Munnik, T. y van den Ende, H. (1991). Cyclic variations in the permeability of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 589-598.

Dirick, L., Moll, T., Auer, H. y Nasmyth, K. (1991). Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* **351**: 754-757.

Dorer, R., Pryciak, P.M. y Hartwell, L.H. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* cells execute a default pathway to select a mate in absence of pheromone gradients. *J. Cell Biol.* **131**: 845-862.

Doyle, T. y Botstein, D. (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3886-3891.

Drubin, B., Miller, K. y Botstein, D. (1988). Yeast actin binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**: 2551-2561.

Elion, E.A. (1995). Ste5 a meeting place for MAP kinases and their associates. *Trends Cell Biol.* **5**: 322-327.

Elion, E.A., Grisafi, P.L., y Fink, G.R. (1990). FUS3 encodes a *cdc2+*/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* **60**: 649-664.

Elion, E.A., Satterberg, B., y Kranz, J.E. (1993). FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol. Biol. Cell* **4**: 495-510.

Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**: 1664-1672.

Epp, J.A. y Chant, J. (1997). An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr. Biol.* **7**: 921-929.

Errede, B., Cade, R.M., Yashar, M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K. y Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular Reproduction and Development* **42**: 477-485.

Epstein, C.B. y Cross, F.R. (1992). *CLB5* a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes and Dev.* **6**: 1695-1706.

Fankhauser, C. y Simanis, V. (1994). The *cdc7* protein kinase is a dosage dependent regulator of septum formation in fission yeast. *EMBO J.* **13**: 3011-3019.

Ferguson, M.A.J. (1991). Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail. *Biochem. Soc. Trans.* **20**: 243-256.

Fields, S. y Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.

Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A. y Nasmyth, K. (1992). Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **3**: 805-818.

Fleet, G.H. (1991). Cell walls. p. 199-277 en A.H. Rose y J.S. Harrison (ed.), *The Yeast*, vol. 4, 2nd ed. academic Press Ltd., Londres.

Flescher, E.G., Madden, K. y Snyder, M. (1993). Components required for cytokinesis are important for bud selection in yeast. *J. Cell Biol.* **122**: 373-386.

Foor, F., Douglas, C.M., El-Sherbeini, M., Morin, N., Marrinan, J.A., Clemas, J.A., Mandala, S.M., Frommer, B.R., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Williamson, J., Bonfiglio, C. y Kurtz, M.B. (1994). *FKS1* and *FKS2* of *Saccharomyces cerevisiae* encode highly similar integral membrane proteins which are likely subunits of distinct 1,3- $\beta$ -D-glucan synthases, p 116. *En Abstracts del Congreso de Genética de Levaduras y Biología Molecular. the Genetics Society of America, Seattle.*

Ford, S.K. y Pringle, J.R. (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of *CDC11* gene product and the timing of events at the budding site. *Dev. Genet.* **12**: 281-292.

Garvik, B., Carson, M. y Hartwell, L.H. (1995). Single stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol. Cell Biol.* **15**: 6128-6138.

Gehring, S. y Snyder, M. (1990). The SPA2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is important for pheromone induces morphogenesis and efficient mating. *J. Cell Biol.* **111**: 1451-1464.

Ghiara J.B., Richardson H.E., Sugimoto K., Henze M., Lew D.J., Wittenberg C. y Reed S.I. (1991). A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic antivation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* **65**: 163-174.

Gietz, R.D. y Sugino, A. (1988). New yeast *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., y Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth regulation by starvation and Ras. *Cell* **68**: 1077-1090.

Glotzer, M. (1997). Cytokinesis. *Current Biol.* **7**: 274-276.

Glotzer, M., Murray, A.W. y Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138.

Govindan, B., Bowser, R. y Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* **128**: 1055-1068.

Gray J.V., Ogas J.P., Kamada Y., Stone M., Levin D.E. y Herskowitz I. (1997). a role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* **16**: 4924-4937.

Griffiths, D.J.F., Barbet, N.C., McCready, S., Lehman, A.P. y Carr, A.M. (1995). Fission yeast rad17: a homologue of budding yeast RAD24 that shares region of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J.* **14**: 5812-5823.

Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Richardson, M., De Barros Lopes, M. y Reed, S.I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6255-6259.

Halme, A., Micelitch, M., Michell, E. y Chant, J. (1996). Bud10p resembles a transmembrane receptor and is part of the cell division remnant recognized for axial polarization and budding in yeast. *Curr. Biol.* **6**: 570-579.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Harold, F.M. (1995). From morphogenes to morphogenesis. *Microbiol.* **141**: 2765-2778.

Hartwell, L.H. (1971a). Genetic control of cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation. *J. Mol. Biol.* **59**: 183.

Hartwell, L.H. (1971b). Genetic control of cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp. Cell Res.* **69**: 265.

Hartwell, L.H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38**: 164.

Hartwell, L.H. y Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-634.

Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R. y Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**: 46.

Hereford, L.M. y Hartwell, L.H. (1974). Sequential gene function in the initiation of *S. cerevisiae* DNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **84**: 445-461.

Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. y Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.

Horisberger, M. y Vonlanthen, M. (1977). Localization of mannan and chitin on thin sections of budding yeast with gold markers. *Arch. Microbiol.* **115**: 1-7.

Hoyt, M.A. (1997). Eliminating all obstacles: regulated proteolysis in the eukaryotic cell cycle. *Cell* **91**: 149-151.

Hoyt, M.A., Trotis, L. y Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss microtubule function. *Cell* **66**: 507-517.

Huffaker, T.C., Thomas, J.H. y Botstein, D. (1988). Diverse affects of  $\beta$ -tubulin mutations on microtubule formation and function. *J. Cell Biol.* **106**: 1997-2010.

Hyman, A.A. y Stearns, T. (1992). Spindle positioning and cell polarity. *Cur. Biol.* **2**: 469.

Jacobs, C.W., Adams, A.E.M., Szanizslo, P.J. y Pringle, J.R. (1988). Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **107**: 1409-1426.

Jiménez, J., Cid V.J., Yuste-Rojas, M., Molero, G., Nombela, C. y Sánchez, M. (1998). Morphogenesis beyond late M phase arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. Enviada para su publicación.

- Johnston G.C., Pringle J.R. y Hartwell L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* **105**: 79-98.
- Johnston, L.H., Eberly, S.L., Chapman, J.W., Araki, H. y Sugino, A. (1990). The product of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle gene *DBF2* has homology with protein kinases and is periodically expressed in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1358-1366.
- Johnston, M. y Davis, R.W. (1984). Sequences that regulate the divergent *GALI-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **4**: 1440-1448.
- Kim, H.B., Haarer, B.K. y Pringle J.R. (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. *J. Cell Biol.* **112**: 535-544.
- Kitada, K., Johnson A.L., Johnston, L.H. y Sugino A. (1993). A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as *CDC5*. *Mol. Cell Biol.* **13**: 445-4457.
- Klis, F.M. (1994). Cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869.
- Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. y Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. *J. Biol. Cell.* **272**: 17762-17775.
- Konopka, J.B., DeMattei, C. y Davis, C. (1995). *AFR1* promotes polarized morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **15**: 723-730.
- Kühne, C. y Linder, P. (1993). A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J.* **12** (9): 3437-3447.
- Kurunda, M.J. y Robbins, P.W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **266**: 19758-19767.
- Larriba, G., Andaluz, E. Cueva, R. y Basco, R.D. (1995). Molecular biology of yeast exoglucanases. *FEBS. Microbiol. Lett.* **125**: 121.
- Leberer, E., Thomas, D.Y., y Whiteway, M. (1997). Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Trends Cell Biol.* **5**: 322-327.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. y Levin, D.E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signaling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* **12**: 172-182.
- Leeuw, T., Fourest-lieuvain, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, D.Y. y Leberer, E. (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with protein. *Science* **270**: 1210-1213.
- Lew, D.J., Marini, N.J. y Reed, S.I. (1992). Different G1 cyclins control the timing of cell cycle commitment in mother and daughter cells of the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **69** : 317-327.
- Lew, D.J. y Reed, S.I. (1992). A proliferation of cyclins. *Trends Cell Biol.* **2** : 77-81.
- Lew, D.J. y Reed, S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by *cdc28* and cyclins. *J. cell Biol.* **120**: 1305- 1320.
- Lew, D.J. y Reed, S.I. (1995). A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* **129**: 739749.

Lillie, S.H. y Brown, S.S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional miosin, Myo2p, and the putative kinesin related protein Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **125**: 825-842.

Lippincott, J. y Li, R. (1998). Sequential Assembly of miosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ting structure involved in budding yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* **140**: 355-366.

Liu, H. y Bretscher, A. (1992). Characterization of *TPM1* disrupted yeast cells indicates and involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J. Cell Biol.* **118** :285-299.

Longtine, S.M., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C. y Pringle, J.R. (1996). the septins: roles in cytokinesis and other proceses. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**: 106-119.

Lörincz, A. y Reed, S.I. (1984). Primary structure homology between the product of the yeast division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**: 183-185.

Lydall, D. y Weinert, T. (1995). Yeast checkpoints genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**: 1488-1491.

MacNeil, S.A. y Nurse, P. (1997). The molecular and celular biology of the yeast *Saccharomyces*, cell cycle and cell biology. Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Madden, K., Costigan, C. y Snyder, M. (1992). Cell polarity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Cell Biol.* **2**: 22-29.

Madhani, H.D., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1997). MAP kinases with distinct inhibirory functions important for signaling specificity during yeast differenciation. *Cell* **91**: 637-684.

Malavasic, M.J. y Elder, R.T. (1990). Complementary transcripts from two genes necessary for normal meiosis en the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **10**: 2809-2819.

de Marini, D.J., Adams, A.E.M., Fares, H., DeVirgilio, C., Valle, G., Chuang, J.S. y Pringle, J.R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **139**: 75-93.

Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M. y Nombela, C. (1993). Activity of The yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37°C. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 177-184.

Matsui, Y. y Toh-e, A. (1992). Yeast *RHO3* and *RHO4* ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is supressed by a high dose of bud formation genes *CDC42* and *BEM1*. *Mol. Cell Biol.* **12**: 5690-5699.

Michelitch, M. y Chant, J. (1996). A mechanism of Bud1p GTPase action suggested by mutational analysis and immunolocalization. *Curr. Biol.* **6**: 446-454.

Minshull, J., Straight, A., Rudner, A., Derngurg, A. y Murray, A.W. (1996). Protein phosphatase 2A regulates MPF activity and sister chromatid cohesion in budding yeast *Curr. Biol.* **6**: 1609-1620.

Molero, G., Yuste-Rojas, M., Montesi, A., Vázquez, A., Nombela, C. y Sánchez, M. (1993). A *cdc*-like autolytic *Saccharomyces cerevisiae* mutant altered in budding site selection is complemented by *SPO12*, a sporulation gene. *J. Bacteriol.* **172**: 6562-6570.

Monteoliva, L., Sánchez, M., Plá, J. y Nombela, C. (1996). Cloning of *SEC14* gene homologue coding for a putative esencial function. *Yeast* **12**: 1097-1105.

Morishita, T., Mitsuzawa, H., Nakafuku, M., Nakamura S., Hattori, S. y Anraku, Y. (1995). Requeriments of *Saccharomyces cerevisiae* Ras for completion of mitosis. *Science* **270**: 1213-1215.

Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. y Botstein D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **125**: 381-391.

Murray, A.W. (1995). The genetics of cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biol.* **5**: 5-11.

Murray, A.W. y Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Science* **246**: 641-621.

Nash, R., Tokiwa, G., Anand S., Erickson, K. y Fletcher, B. (1988). The *WHI1+* gene of *Saccharomyces cerevisiae* tether cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* **7**: 4335-4346.

Nasmyth, K. (1996). Putting the cell cycle in order *Science* **274**: 1643-1645.

Nasmyth, K. (1983). Molecular analysis of a cell lineage. *Nature* **302** (21): 670-676.

Navarro-García, F., Sánchez, M., Plá, J. y Nombela, C. (1995). functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homologue related to cell integrity. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2197-2206.

Navas, T., Sánchez, Y. y Elledge, S.J. (1996). RAD9 and DNA polymerase epsilon form parallel sensory branches for transducing the DNA damage checkpoint signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**: 2632-2643.

Navas, T., Zhou, Z. y Elledge, S.J. (1995). DNA polymerase epsilon links DNA replication machinery to the S-phase checkpoint *Cell* **80**: 29-39.

Nern, A. y Arkowitz, R.A. (1998). A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature* **391**: 195-198.

Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. y Hegemann, J.H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**: 773-786.

Nombela, C., Molina, M., Cenamor, R. y Sánchez, M. (1988). Yeast  $\beta$ -glucanases, a complex system of secreted enzymes. *Microbiol. Sci.* **5**: 328-332.

Novick, P. y Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40**: 405-416.

Novick, P. y Brennwald, P. (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* **75**: 597-601.

Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **14**: 447-451.

Nurse, P. (1997). Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91**: 865-867.

Ogas, J., Andrews, B.J. y Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2* and a putative new G1 cyclin (*HCS26*) by *SWI4*, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**: 1015-1026.

Orlean, P. (1997). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, cell cycle and cell biology. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Pardo, M., Monteoliva, L., Sánchez, M., Gil, C. y Nombela, C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: a reference map of the proteins secreted by regenerating protoplast. Enviada para su publicación.

Park, H.O., Chant, J. y Herskowitz, I. (1993). *BUD2* encodes a GTPase activating protein for *BUD1/RSR1* necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature* **365**: 269-274.



Park, H.O., Erfei, B., Pringle, J.R. y Herskowitz, I. (1997). Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determinate yeast cell polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4463-4468.

Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., y Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* **73**: 747-760.

Pringle, J.R. y Hardwell, L.H. (1981). The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance. Ed.: Cold Spring Harbor.

Printen, J.A. y Sprague, G.F. (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-619.

Radclyffe, L.R. y Fink, G.R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes and Dev.* **8**: 2974-2985.

Reed, S.I. (1992). The role of p34 kinases on the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 529-561.

Roberts, R.L. y Fink, G.R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**: 2974-2985.

Roemer, T., Vallier, L.G. y Snyder, M. (1996). Selection of polarized growth sites in yeast. *Trends Cell Biol.* **6**: 434-441.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. y Fink, G.R. (1987). A *S. cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* **60**: 237-243.

Rudner, A.D. y Murray, A.W. (1996). The spindle assembly checkpoint. *Curr. Op. Cell Biol.* **8**: 773-780.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

San José, C., Alonso, R., Pérez-Díaz, R.M., Plá, J. y Nombela, C. (1996). The mitogen activated protein kinase homologue *HOG1* gene control glicerol acumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **178**: 5850-5852.

Sánchez, Y. (1996). Regulation of RAD53 by ATM like kinase MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoints pathways. *Science* **271**: 357-360.

Sanders, S.L. y Herskowitz, I. (1996). The Bud4 protein of yeast, required for axial budding, is localized to the mother/bud neck in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Biol.* **134**: 413-427.

Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S. y Fonzi, W.A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* **15**: 601-613.

Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. and Simanis, V. (1997). The Spg1p GTPase essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes and Dev.* **11**: 1519-1534.

Schneider, B.L., Yang, Q.H. y Futcher, A.B. (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* **272**: 560-562.

Schwab, M., Schulze, L. y Seufert, W. (1997). Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* 90: 683-693.

Schweitzer, B. y Philippsen, P. (1991). *CDC15*, an essential cell cycle gene in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a protein kinase domain. *Yeast* 7: 265-273.

Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M.D. y Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p4OSIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233-244.

Schwob, E. y Martin, R.P. (1992). New yeast actin like genes required late in the cell cycle. *Nature* 355: 179-182.

Shirayama, M., Matsui, Y. y Toh-e, A. (1994b). The yeast *TEM1* gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Mol. Cell Biol.* 14: 7476-7482.

Shirayama, M., Matsui, Y., Tanaka, K. y Toh-e, A. (1994a). Isolation of a *CDC25* family gene, *MSI1/LTE1*, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast* 10: 451-461.

Shirayama, M., Matsui, Y. y Toh-e, A. (1996). Dominant mutant alleles of yeast protein kinase gene *CDC15* suppress the *lte1* defect in termination of M phase and genetically interact with *CDC14*. *Mol. Gen. Genet.* 251: 176-185.

Snyder, M., Gehrung, S. y Page, B.D. (1991). Studies concerning the temporal and genetic control of cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 114: 515-532.

Sohrmann, M., Schmidt, S., Hagan, I. y Simanis, V. (1998). Asymmetric segregation on spindle poles of the *Schizosaccharomyces pombe* septum-inducing protein kinase Cdc7p. *Genes and Dev.* 12: 84-94.

Spevak, W., Keiper, B.D., Stratowa, C. y Castañón, M.J. (1993). *Saccharomyces cerevisiae cdc15* mutants arrested at late stage in anaphase are rescued by *Xenopus* cDNAs encoding N-ras or a protein with  $\beta$ -transducin repeats. *Mol. Cell Biol.* 13: 4953-4966.

Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. y Davis, R.W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomus replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039.

Sun, Z., Fay, D.S., Marini, F., Foiani, M. y Stern, D.F. (1996)m Spk-1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent proteins phosphorylation in DNA replication damage checkpoint pathway. *Genes Dev.* 10: 395-405.

Surana, U., Amon, A., Dowzer, C., McGrew, J., Byers, B. y Nasmyth, K. (1993). Destruction of yeast CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* 12: 1969-1978.

Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B. y Nasmyth, K. (1991). The role of *CDC28* and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65: 145-161.

Taylor, G.S., Liu, Y., Baskerville, C. y Charbonneau, H. (1997). The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is requires for cell cycle progresion. *J. Biol. Chem.* 272: 24054-24063.

Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J. y Hartwell, L.H. (1997). *CDC5* and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* 90: 1097-1106.

Torres, L., Martín, H., García-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. y Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotyoe of *Saccharomyces cerevisiae* *Lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.* 5: 2845-2854.

Toyn, J.H. y Johnston, L.H. (1993). Spo12 is a limiting factor that interacts with the cell cycle protein kinases Dbf2 and Dbf20, which are involved in mitotic chromatid disjunction. *Genetics Society of america*. **135**: 963-971.

Toyn, J.H. y Johnston, L.H. (1994). The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition. *EMBO J.* **13**: 1103-1113.

Toyn, J.H., Johnson, A. y Johnston, L.H. (1995). Segregation of unreplicated chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel G1/M-phase checkpoint. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5312-5321.

Toyn, J.H., Johnson, A.L., Donovan, D., Toone, W.M. y Johnston, L.H. (1996). The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics* **145**: 85-96.

Valtz, N., Peter, M. y Herskowitz, I. (1995). *FAR1* is required for oriented polarization of yeast cells in response to mating pheromones. *J. Cell Biol.* **131**: 863-873.

Waddle, J.A., Karpova, T.S., Waterston, R.H. y Cooper, J.A. (1996). Movement of cortical actin patches in yeast. *J. Cell Biol.* **132**: 861-870.

Wan, J., Xu, H. y Grunstein, M. (1992). *CDC14* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 11274-11280.

Weinert, T.A., Kiser, G.L. y Hartwell, L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* **8**: 652-665.

Whiteway, M., Clark, K.L., Leberer, E., Dignard, D. y Thomas, D.Y. (1994). Genetic identification of residues involved in association of  $\alpha$  and  $\beta$  G-protein subunits. *Mol. Cell Biol.* **14**: 3223-3229.

Whiteway, M., Wu, C., Leeuw, T., Clark, K.L., Fourest, A. y Thomas, D.Y. (1995). Association of the yeast pheromone response G-protein  $\beta$ - $\gamma$  subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572-1575.

Winey, M., Goestch, L., Baum, P. y Byers, B. (1991). *MPS1* and *MPS2*: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* **114**: 745-754.

Wittenberg, C. y Reed, S.I. (1988). Control of the yeast cell cycle is associated with assembly/disassembly of the Cdc28 protein kinase complex. *Cell* **54**: 1061-1072.

Yamamoto, Y.A., Guacci, V. y Koshland, D. (1996). Pds1 an inhibitor of anaphase in budding yeast plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell. Biol.* **133**: 99-110.

Yamochi, W., Tanaka, J., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. y Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **125**: 1077-1093.

Yang, S.S., Yeh, E., Salmon, E.D. y Bloom, K., (1997). Identification of a mid-anaphase checkpoint in budding yeast. *J. Cell Biol.* **136**: 345-354.

Yuste, M. (1995). Tesis doctoral.

Zachariae, W., Shi, T.H., Galova, M., Obermaier, B. y Nasmyth, K. (1996). Identifications of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **274**: 1201-1204.

Zahner, J.E., Harkins, H.A. y Pringle, J.R. (1996). Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **16**: 1857-1870.

Zarzov, P., Mazzoni, C. y Mann, C. (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* **15**: 83-91.

Zheng, Y., Cerione, R.A. y Bender, A. (1993). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42: catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J. Biol. Chem.* **269**: 2369-2372.